

**Eigenschaften und Funktion der M25-Proteine des
murinen Cytomegalovirus - Schlüsselfaktoren des viral
induzierten cytopathischen Effekts**

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Corinna Benkartek

geboren am 13.11.1979 in Heide

2010

Referent: Prof. Dr. Martin Messerle

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Pietschmann

Tag der Promotion: 23.07.2010

Zusammenfassung

Humane und murine Cytomegaloviren (HCMV und MCMV) induzieren in infizierten Zellen einen cytopathischen Effekt, der zu einer veränderten Aktin-Cytoskelettstruktur und Zellabrundung führt. In MCMV-infizierten Zellen wird dieser Effekt durch Genprodukte des M25 Open reading frames (ORF) ausgelöst, der für mehrere virale Proteine kodiert. Der Mechanismus der durch MCMV ausgelösten Veränderungen im Cytoskelett ist bisher nicht geklärt. Es war daher das Ziel dieser Arbeit, die Eigenschaften und Funktionen der durch den M25 ORF exprimierten verschiedenen M25-Proteine zu untersuchen. Hierzu wurden unterschiedliche MCMV- und retrovirale Virusvarianten hergestellt, um die subzelluläre Lokalisation von M25-Proteinen sowie deren Kolokalisation mit zellulären Proteinen zu analysieren.

Die Deletion des M25 ORFs im MCMV-Genom inhibiert die Initiation des cytopathischen Effektes der Zellabrundung und führt zur leichten Beeinträchtigung der Virusreplikation. Die Synthese viraler Proteine wird dagegen durch die Deletion nicht beeinträchtigt. Die exklusive Expression der beiden größten M25-Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 mittels retroviraler Vektoren zeigte, dass beide Proteine eine Abrundung muriner Fibroblasten auch unabhängig von einer MCMV-Infektion auslösen. Eine Auflösung der Fokalkontakte erfolgte dagegen nur im Kontext einer MCMV-Infektion.

Sowohl bei retroviraler Transduktion als auch bei einer MCMV-Infektion lokalisieren M25-Proteine hauptsächlich im Zellkern. In MCMV-infizierten Zellen sind zudem zu späteren Zeitpunkten auch im Cytoplasma M25-Proteine nachweisbar. In der Aminosäuresequenz der M25-Proteine wurde ein potentiellies Kernimportsignal identifiziert. Die Mutation dieses Signals zeigte, dass die nukleäre Lokalisation der M25-Proteine durch dieses Kernimportsignal vermittelt wird. Weitere Untersuchungen mit dieser Virusvariante ergaben, dass die Initiation des cytopathischen Effektes zur Zellabrundung durch M25-Proteine nicht von deren nukleären Lokalisation abhängig ist.

Im Zellkern bilden M25-Proteine kugelförmige Aggregate. Diese Aggregate kolokalisieren mit zellulären ND10 *domains*, für die eine Beteiligung an der zellulären Interferonantwort vermutet wird. Retroviral exprimierte M25-Proteine lösen eine Reorganisation der ND10 *domains* aus. Durch die Mutation eines SUMO *interacting motifs* in der M25-Sequenz wurde die Kolokalisation mit ND10 *domains* sowie deren Reorganisation unterbunden. Vornehmlich zu frühen Zeitpunkten einer MCMV-Infektion ist bei Stimulation durch IFN β die Replikationsfähigkeit einer M25-Deletionsmutante vermindert, was auf eine mögliche Interferon-antagonistische Funktion von M25-Proteinen hindeutet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass M25-Proteine mehrere Funktionen während der MCMV-Infektion ausüben. Neben der Induktion des cytopathischen Effekts beeinflussen sie die Anzahl der ND10 *domains* und spielen möglicherweise eine Rolle in der Umgehung der zellulären Interferon-Antwort durch MCMV.

Cytomegalovirus, Cytopathischer Effekt, M25-Proteine

Abstract

Upon infection with human and murine cytomegaloviruses (HCMV and MCMV) a cytopathic effect is induced, which leads to a change in the structure of the actin cytoskeleton followed by rounding of the infected cells. In MCMV infected cells, this effect is induced by gene products of the M25 open reading frame (ORF), which encodes several viral proteins. The way in which MCMV induces these changes in the cytoskeleton is not known. The aim of this study was therefore to analyse the features and functions of the distinct M25 proteins expressed by the M25 ORF. To this end several MCMV mutants and retroviral expression vectors were constructed, to determine the subcellular localization of M25 proteins as well as their potential colocalization with cellular proteins.

The deletion of the M25 ORF in the MCMV genome inhibited the induction of the cytopathic effect of cell rounding and lead to a slight reduction of viral replication. The synthesis of viral proteins was not affected by the deletion of the M25 ORF. Retroviral expression of the two major M25 proteins M25-ATG2 and M25-ATG6 separately revealed that both proteins are capable of inducing the rounding of murine fibroblasts independently of MCMV infection. The destruction of focal adhesions however appeared only as a result of a MCMV infection.

During MCMV infection as well as after retroviral transduction M25 proteins were localized mainly in the nucleus. At later timepoints of the MCMV infection M25 proteins were also detectable in the cytoplasm.

A putative nuclear import signal was found by analysis of the M25 amino acid sequence. By mutation of this signal it was shown that the nuclear localization of M25 proteins is indeed mediated by this nuclear import signal. Further analysis of this virus mutant revealed that the induction of the cytopathic effect is not dependent on the nuclear localization of M25 proteins.

M25 proteins form spherical aggregates in the nucleus. These aggregates colocalized with cellular ND10 domains, which are believed to take part in the cellular interferon response. Retrovirally expressed M25 proteins induced a reorganization of ND10 domains. After the mutation of a putative SUMO interacting motif in the M25 sequence the colocalization with ND10 domains as well as the reorganization of these domains was prevented.

Especially at early timepoints of infection the replication capacity of a M25 deletion mutant was reduced by IFN β . This effect suggests a putative function of M25 proteins as antagonists of the cellular interferon response.

The results of this study revealed several functions of the M25 proteins during MCMV infection. In addition to the induction of the cytopathic effect, M25 proteins reduce the number of ND10 domains and possibly contribute to the MCMV induced evasion of the cellular IFN response.

Cytomegalovirus, Cytopathic effect, M25 Proteins

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Martin Messerle im Institut für Virologie der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt. Ich danke Martin Messerle für die vielen angeregten Diskussionen und für die Unterstützung während meiner Promotion, aber auch dafür, dass er mir die Möglichkeiten und den Freiraum gegeben hat, eigene Ideen zu entwickeln und zu verwirklichen.

Bei Prof. Thomas Pietschmann vom TWINCORE-Zentrum für Experimentelle und Klinische Infektionsforschung bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Korreferats. Mein Dank gilt Prof. Edgar Maiss vom Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz der Leibniz-Universität Hannover für die Übernahme des Disputations-Vorsitzes.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Messerle bedanke ich mich für die lebhafteste Unterstützung und Hilfsbereitschaft, aber auch für die lustigen „Kaffeerunden“. Besonderer Dank gilt Andreas Busche, Penelope Kay-Jackson und Sarah Sengstake, die immer viel Interesse, gute Ideen und Anregungen für meine Arbeit eingebracht haben. Auch bei den Mitgliedern des gesamten Instituts für Virologie möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und die jederzeitige Hilfsbereitschaft bedanken.

Ganz besonders danke ich Michael Templin für die unzähligen Stunden des Lesens, Diskutierens und die Geduld, die er während des gesamten Zeitraums meiner Arbeit, aber insbesondere während der Fertigstellung dieser Arbeit für mich aufgebracht hat.

Mein Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern und meiner Familie, die mich in meiner Arbeit stets unterstützt und bestärkt haben. Auch bei meinen Freunden bedanke ich mich für die Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit und für die Möglichkeit, auch mal nicht an die Arbeit zu denken. Besonders bedanken möchte ich mich bei Jorma Reinke für die LATEX-Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Biologie der Cytomegaloviren	1
1.1.1	Herpesviren	1
1.1.2	Klinische Bedeutung der Cytomegaloviren	2
1.1.3	Replikationszyklus der Cytomegaloviren	3
1.1.4	Das murine Cytomegalovirus (MCMV)	7
1.2	Viral induzierte Veränderungen des Cytoskeletts	8
1.2.1	Aufbau und Regulation des Aktin-Cytoskeletts	8
1.2.2	Fokalkontakte	10
1.2.3	Manipulation des Cytoskeletts durch Viren	11
1.2.4	Modifizierung des Aktin-Cytoskeletts durch Cytomegaloviren	13
1.3	Induktion des cytopathischen Effekts durch MCMV M25-Genprodukte	14
1.3.1	Induktion der Zellabrundung	14
1.3.2	M25-Transkription und -Proteinsynthese	16
1.4	Cytomegaloviren und das Interferonsystem	18
1.4.1	Das Interferonsystem	18
1.4.2	Blockierung der Interferon-Antwort durch Cytomegaloviren	19
1.5	Protein-Modifikation durch SUMO	22
1.5.1	Eigenschaften der SUMO-Proteine	22
1.5.2	Kovalente und nicht-kovalente SUMOylierung	24
1.6	ND10 <i>domains</i> und PML-Proteine in der CMV-Infektion	25
1.6.1	Zusammensetzung und Funktionen der ND10 <i>domains</i>	25
1.6.2	ND10 <i>domains</i> in der viralen Infektion	28
1.7	Ziel der Arbeit	30
2	Material und Methoden	32
2.1	Material	32
2.1.1	Reagenzien und Chemikalien	32
2.1.2	Laborgeräte und Verbrauchsmaterial	32
2.1.3	Zellen und Bakterienstämme	33
2.1.4	Antikörper und Antibiotika	34
2.1.5	Plasmide und BACs	34
2.2	Eukaryotische und bakterielle Zellkultur	36
2.2.1	Kultur eukaryotischer Zellen	36
2.2.2	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	36
2.2.3	Zellzahlbestimmung	37
2.2.4	Bakterienkultur	37
2.3	Molekularbiologische Methoden	37

2.3.1	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	37
2.3.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen durch Elektroporation	38
2.3.3	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	38
2.3.4	Präparation von BAC-DNA aus <i>E. coli</i>	39
2.3.5	Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA	39
2.3.6	Restriktion von Plasmid-DNA mit Endonukleasen	40
2.3.7	Restriktion von BAC-DNA mit Endonukleasen	40
2.3.8	Dephosphorylierung und Ligation von DNA	40
2.3.9	Agarose-Gelelektrophorese	40
2.3.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
2.3.11	Quick Mutagenese PCR	41
2.4	Protein-Biochemische Methoden	44
2.4.1	Herstellung von Proteinlysaten	44
2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.4.3	Proteintransfer	45
2.4.4	Immunfärbung	46
2.5	Mikroskopie	46
2.5.1	Immunfluoreszenz	46
2.5.2	Messung der Zelllängen retroviral transduzierter Fibroblasten . . .	47
2.5.3	Bestimmung der Anzahl der ND10 <i>domains</i> in Fibroblasten	48
2.6	Virologische Methoden	49
2.6.1	Infektion muriner Zellen mit MCMV	49
2.6.2	Herstellung von Virus-Stocks	49
2.6.3	Virus-Titerbestimmung durch Plaque Assays	50
2.6.4	Rekonstitution von Viruspartikeln aus BAC-DNA	50
2.6.5	Virus-Replikationsanalysen	51
2.6.6	Präparation viraler DNA	52
2.7	Modifizierung von BACs durch Flp-vermittelte Rekombination	53
2.8	Herstellung retroviraler Expressionsvektoren	55
2.8.1	Klonierung der retroviralen Vektoren pSF M25-ATG2 und pSF M25-ATG6	55
2.8.2	Produktion von Retroviren	56
2.8.3	Retrovirale Transduktion	57
2.8.4	Bestimmung retroviraler Titer	57
3	Ergebnisse	59
3.1	Virale Proteinexpression und Replikation nach Infektion mit einem MCMV Δ M25-Virus	59
3.1.1	Expression viraler Proteine während einer MCMV Δ M25-Infektion . . .	59
3.1.2	Einfluss der M25-Genprodukte auf die Replikation von MCMV . . .	61
3.2	Lokalisation der M25-Proteine während der MCMV-Infektion	62
3.2.1	Herstellung eines GFP exprimierenden M25HA-Virus	62
3.2.2	Subzelluläre Lokalisation von M25-Proteinen während der MCMV-Infektion	63
3.3	Expression von MCMV M25-Proteinen durch retrovirale Vektoren	65
3.3.1	Herstellung retroviraler Vektoren zur Expression von M25-Proteinen . . .	66

3.3.2	Expression der M25-ATG2- und M25-ATG6-Proteine durch retrovirale Vektoren	68
3.3.3	Subzelluläre Lokalisation der M25-Proteine bei MCMV-unabhängiger Expression	69
3.4	Das potentielle Kernimportsignal der M25-Proteine	72
3.4.1	Identifizierung eines Kernimportsignals in der M25-Aminosäuresequenz	72
3.4.2	Mutation des Kernimportsignals im retroviralen Vektor pSF M25-ATG6	73
3.4.3	Subzelluläre Lokalisation der M25-Proteine nach Mutation des Kernimportsignals	74
3.5	Rolle des M25-Kernimportsignals in der MCMV-Infektion	75
3.5.1	Mutation des Kernimportsignals im viralen M25 ORF	75
3.5.2	Expression des M25 NLSmut-Proteins durch MCMV	77
3.5.3	Lokalisation des MCMV M25HA NLSmut-Proteins	78
3.6	Veränderung der Morphologie muriner Zellen durch M25-Proteine	80
3.6.1	Einfluss der M25-ATG2- und M25-ATG6-Proteine auf die Morphologie muriner Fibroblasten	80
3.6.2	Einfluss der Mutation des M25-Kernimportsignals auf die Morphologie transduzierter Fibroblasten	82
3.6.3	Morphologie muriner Fibroblasten nach Mutation des Kernimportsignals im viralen M25 ORF	83
3.7	Expression des Fokalkontakt-Proteins Paxillin in infizierten und transduzierten Zellen	84
3.7.1	Fokalkontakte in MCMV-infizierten Zellen	85
3.7.2	Fokalkontakte in M25-exprimierenden Zellen	87
3.8	M25-Proteine und ND10 <i>domains</i>	88
3.8.1	Kolokalisation von M25-Proteinen mit ND10 <i>domains</i>	88
3.8.2	Einfluss von M25-Proteinen auf ND10 <i>domains</i>	90
3.8.3	Einfluss der subzellulären Lokalisation von M25-Proteinen auf ND10 <i>domains</i>	93
3.8.4	Bedeutung der M25-Proteine für die Interferon-Toleranz von MCMV	95
3.9	ND10 <i>domains</i> in der MCMV-Infektion	98
3.9.1	Lokalisation von PML-Proteinen in MCMV-infizierten Zellen	98
3.9.2	Lokalisation von PML- und M25HA NLS mut-Proteinen im Verlauf der MCMV-Infektion	100
3.10	Mögliche Modifizierung der M25-Proteine durch SUMO	102
3.10.1	SUMO <i>interacting motifs</i> in der M25-Sequenz	102
3.10.2	Mutation der potentiellen SUMO <i>interacting motifs</i> im retroviralen Vektor pSF M25-ATG6	103
3.10.3	Auswirkung der Mutation der potentiellen SIMs auf die Kolokalisation von M25-Proteinen und ND10 <i>domains</i>	104
4	Diskussion	107
4.1	M25-Proteine begünstigen die MCMV-Infektion <i>in vitro</i>	107
4.2	Subzelluläre Lokalisation der M25-Proteine	109

4.2.1	M25-Proteine lokalisieren im Zellkern, später auch im Cytoplasma MCMV-infizierter Zellen	109
4.2.2	Die M25-Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 zeigen eine identische nukleäre Lokalisation	110
4.3	MCMV-unabhängige Induktion der Zellabrundung durch M25-Proteine . .	112
4.3.1	Die M25-Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 induzieren morphologische Veränderungen in Fibroblasten	112
4.3.2	Nukleäre und cytoplasmatische M25-Proteine induzieren Veränderungen in der Zellmorphologie	113
4.3.3	Eine MCMV-Infektion zerstört die Fokalkontakte infizierter Zellen .	116
4.3.4	Möglicher Mechanismus zur Induktion der Zellabrundung durch M25-Proteine	117
4.4	Eigenschaften der M25-Proteine im Zellkern	118
4.4.1	M25-Proteine kolokalisieren mit nukleären ND10 <i>domains</i>	118
4.4.2	ND10 <i>domains</i> werden durch M25-Proteine reorganisiert	120
4.4.3	SUMO-vermittelte Reorganisation der ND10 <i>domains</i> durch M25- Proteine	122
4.4.4	Mögliche Interferon-antagonistische Funktion von M25-Proteinen . .	124
4.5	Mögliche Funktionen der M25-Proteine während der MCMV-Infektion . . .	126
Literaturverzeichnis		128
Abbildungsverzeichnis		145
Tabellenverzeichnis		147
Anhang		149

KAPITEL 1

EINLEITUNG

1.1 Biologie der Cytomegaloviren

1.1.1 Herpesviren

Cytomegaloviren gehören zur Familie der Herpesviridae, welche mehr als 100 verschiedene tier- und humanpathogene Viren umfasst [Pellett and Roizman, 2007]. Charakteristisch für diese Virusfamilie ist der Aufbau der Viruspartikel, die aus vier Strukturkomponenten bestehen (Abbildung 1.1). Die doppelsträngige, lineare DNA wird von einem Kapsid umschlossen, welches einen Durchmesser von ca. 100 nm besitzt. Das Kapsid wird von Tegument umhüllt, welches aus viralen, aber auch zellulären Proteinen und RNA besteht. Eine Membran zellulärer Herkunft mit eingelagerten viralen Glykoproteinen bildet eine Hülle um Kapsid und Tegument. Eine weitere Eigenheit aller Herpesviren ist das Vorhandensein virusspezifischer Enzyme und anderer Faktoren, die an der Nukleinsäuresynthese beteiligt sind (z.B. DNA-Polymerase, Helicase, Primase). Diese Proteine sind teilweise Bestandteile der Virionen und stehen daher sofort nach der Infektion zur Verfügung [Kalejta, 2008]. Ein wesentliches Charakteristikum der Herpesviridae ist die Fähigkeit, nach einer oftmals symptomlosen Primärinfektion in den Zustand der Latenz überzugehen und lebenslang im Wirt zu verbleiben. In latent infizierten Zellen liegt das Virusgenom episomal vor und es werden nur wenige virale Gene exprimiert. Durch bestimmte endogene und exogene Faktoren (z.B. Stress oder Immunsuppression) kann es zu einer Reaktivierung der Virusreplikation und gegebenenfalls zu einer Entwicklung von Krankheitssymptomen kommen [Sinclair and Sissons, 2006].

Die Familie der Herpesviridae wird in die drei Unterfamilien Alpha-, Beta- und Gammaherpesvirinae aufgeteilt, die sich sowohl in ihrer Fähigkeit, bestimmte Organismen zu infizieren, als auch in ihrer DNA-Sequenz und im Aufbau ihres Genoms unterscheiden [Pellett and Roizman, 2007]. Alphaherpesviren sind durch ein breites Wirtsspektrum

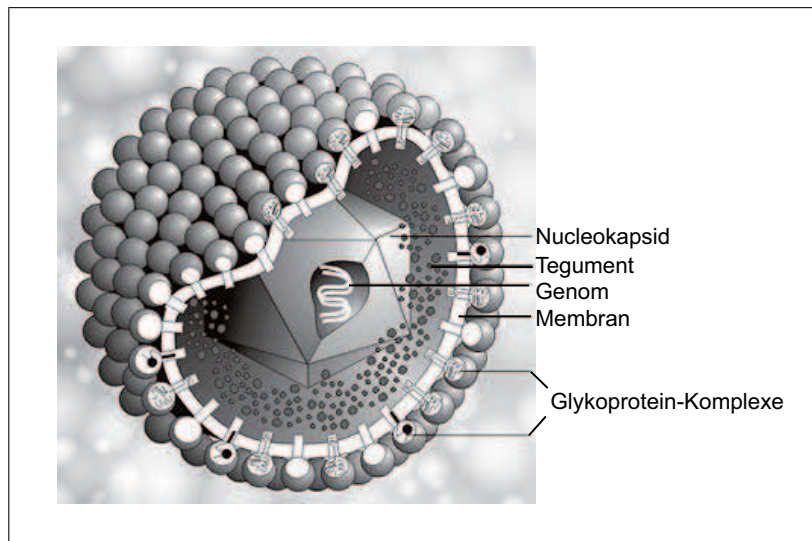


Abbildung 1.1 Schematischer Aufbau der Herpesviren. Herpesviren besitzen eine lineare doppelsträngige DNA, die von einem Nucleokapsid umgeben ist. Das Nucleokapsid wird vom Tegument umhüllt. In die Membran sind virale Glykoprotein-Komplexe eingelagert. Modifiziert nach M. Reschke, 1997 [<http://www.mirrorservice.org/sites/www.virology.net>].

und einen schnellen Replikationszyklus charakterisiert. Wichtige humanpathogene Vertreter der Alphaherpesviren sind die Herpes Simplex Viren Typ 1 (HSV-1) und Typ 2 (HSV-2), sowie das Varizella Zoster Virus (VZV), welches Windpocken und Gürtelrose verursacht. Im Gegensatz zu den Alphaherpesviren zeigen Betaherpesviren eine ausgeprägte Wirtsspezifität und einen langsameren Replikationszyklus. Charakteristisch für Betaherpesviren ist die Fähigkeit, eine Vielzahl unterschiedlicher Zellen infizieren zu können. Die mit Betaherpesviren infizierten Zellen sind häufig vergrößert, was in der Bezeichnung der prominentesten Vertreter der Betaherpesviren, den Cytomegaloviren, zum Ausdruck kommt. Gammaherpesviren zeigen ebenfalls eine ausgeprägte Wirtsspezifität, sind jedoch im Gegensatz zu Betaherpesviren in ihrem Zelltropismus auf die Infektion von T- und B-Lymphozyten beschränkt. Die klinisch bedeutsamsten humanpathogenen Gammherpesviren sind das Epstein-Barr Virus (EBV) als Erreger der Mononukleose und das Humane Herpesvirus-8 (HHV-8), welches das in AIDS-Patienten auftretende Kaposi-Sarkom verursacht und mit B-Zell-Lymphomen in Verbindung gebracht wird [Antman and Chang, 2000].

1.1.2 Klinische Bedeutung der Cytomegaloviren

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) weist eine weltweite Verteilung auf. Abhängig von der geographischen Lage sowie vom sozioökonomischen Status ist eine bis zu 100%ige Seroprävalenz der Bevölkerung in einigen Regionen nachgewiesen worden [Britt, 2008;

Mocarski et al., 2007]. In Westeuropa ist ungefähr 50% der Bevölkerung mit HCMV infiziert. HCMV kann sowohl vertikal (intrauterin) als auch horizontal (extrauterin) übertragen werden, wobei Viruspartikel bisher in Speichel, Urin, Tränenflüssigkeit, Cervix- und Vaginalsekret, Samenflüssigkeit, Muttermilch, Stuhl und Blut nachgewiesen wurden. Cytomegaloviren sind typische opportunistische Pathogene. Bei immunkompetenten Personen verläuft die Infektion zumeist inapparent. Zum Auftreten von klinischen Symptomen kommt es infolge einer Primärinfektion, einer Reaktivierung oder einer Superinfektion von immunsupprimierten, immundefizienten oder immunologisch unreifen Personen [Landolfo et al., 2003]. Hier kann die HCMV-Infektion zu ernststen Komplikationen führen. Die kongenitale Infektion mit HCMV stellt die häufigste virusbedingte Ursache für Behinderungen neugeborener Kinder dar. Durch eine Schädigung des zentralen Nervensystems können Behinderungen von Hör- und Sehvermögen bis zur Mikrocephalie auftreten. Weiterhin kann es zu einer Hepatitis und Milzvergrößerung kommen. In seltenen Fällen kann eine HCMV-Infektion bei Neugeborenen tödlich verlaufen [Landolfo et al., 2003].

Für AIDS-Patienten stellt eine HCMV-Infektion einen der häufigsten Komplikationen dar. In etwa 90% der Patienten führt eine Infektion mit HCMV (primär oder rekurrent) zu klinischen Symptomen in fast allen Organsystemen, wobei die Lunge und das zentrale Nervensystem am stärksten befallen werden. Die CMV-Retinitis tritt ebenfalls häufig als Komplikation bei AIDS-Patienten auf.

Bei Organtransplantationen kann es infolge der immunsuppressiven Therapie vor allem dann zu schweren Komplikationen kommen, wenn ein CMV-negativer Empfänger ein CMV-positives Organ erhält. Für allogene Knochenmark-Transplantatempfänger stellt eine CMV-Infektion die häufigste virusbedingte Todesursache dar [Landolfo et al., 2003]. Es gibt zudem Hinweise, dass die Abstoßungsreaktion „*graft versus host disease*“ durch eine CMV-Infektion ausgelöst werden kann [Britt, 1996]. Durch eine präventive antivirale Therapie können jedoch mittlerweile viele der Komplikationen deutlich gemindert werden [Stocchi et al., 1999]. Der genaue pathogene Mechanismus der HCMV-Infektion ist bisher nicht völlig geklärt, in allen Fällen kommt es jedoch zu einer hohen Virusreplikation in den betroffenen Organen.

1.1.3 Replikationszyklus der Cytomegaloviren

Cytomegaloviren zeigen im Vergleich zu den Vertretern der Alphaherpesviren einen langsamen Replikationszyklus. HCMV durchläuft einen Replikationszyklus in ungefähr 48 bis 72 Stunden, das murine Cytomegalovirus (MCMV) repliziert in ca. 24 Stunden. Der Replikationszyklus der Cytomegaloviren beginnt mit der spezifischen Bindung von Proteinen der Virusmembran an Rezeptormoleküle auf der Zelloberfläche (Abb. 1.2, Schritt (1)). Hierbei vermitteln virale Glykoprotein-Komplexe den Eintritt in die Zelle. HCMV

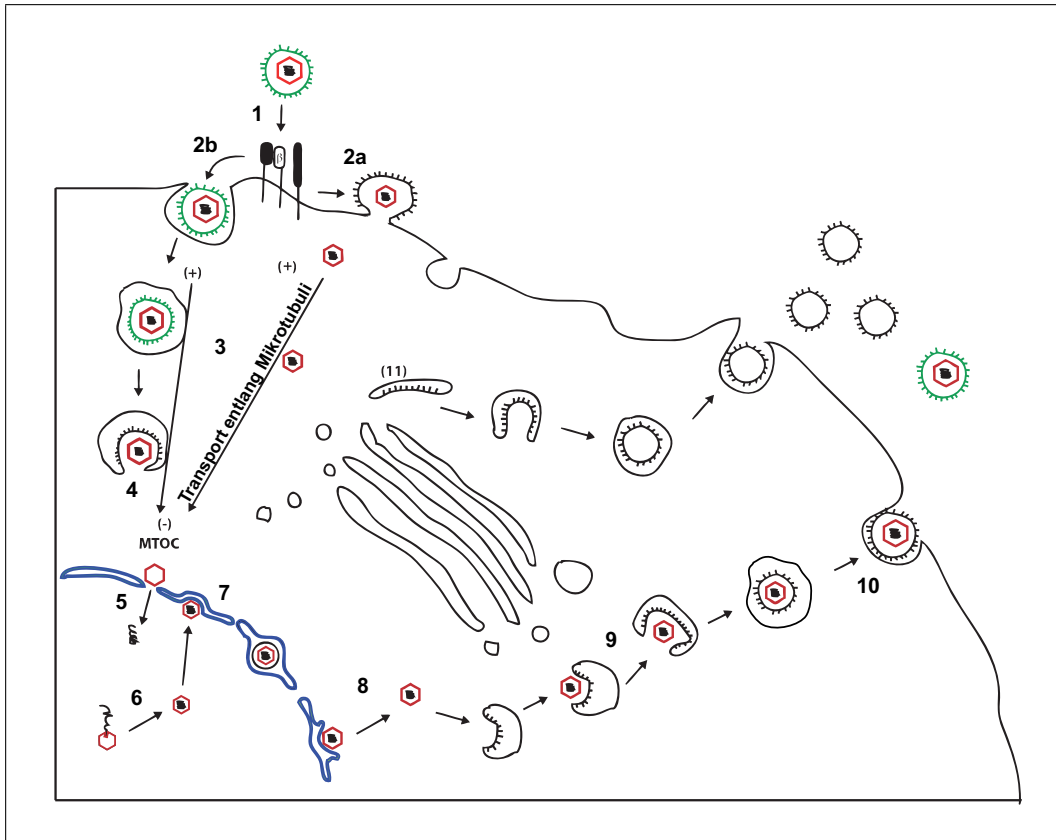


Abbildung 1.2 Replikationszyklus der Herpesviren. Details der einzelnen Replikationsphasen finden sich unter den in der Abbildung angegebenen Ziffern im Text. Modifiziert nach Mettenleiter et al. [2006].

verfügt über mehrere Glykoproteinkomplexe, die zur Infektion unterschiedlicher Zelltypen benötigt werden. Die primäre Bindung des Viruspartikels an Heparansulfat-Proteoglykane auf der Zelloberfläche wird über den Glykoproteinkomplex II (GCII) vermittelt [Kari and Gehrz, 1992]. Dieser Komplex besteht aus den Glykoproteinen gM und gN. Der Glykoproteinkomplex I (GCI) besteht aus einem Dimer des Glykoproteins gB, welches mit verschiedenen Molekülen auf der Zelloberfläche interagieren kann. Dieser Komplex vermittelt eine spezifischere und stabilere Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Bisher wurde angenommen, dass der zelluläre EGF-Rezeptor (Epithelial growth factor-receptor) der spezifische Rezeptor für HCMV ist, diese Annahme ist jedoch in Zweifel geraten [Isaacson et al., 2007]. Vielmehr wird nun als entscheidender Schritt beim Eintritt des Virus in die Zelle eine Interaktion von gB mit einem Integrin-Heterodimer vermutet [Feire et al., 2004]. Abhängig vom Zelltyp, werden zwei unterschiedliche Glykoproteinkomplexe benötigt. Der Glykoproteinkomplex GCIII, bestehend aus gH, gL und gO, induziert eine Fusion der Virusmembran mit der zellulären Plasmamembran (Abb. 1.2, Schritt (2a)), und setzt so das virale Kapsid mit dem Tegument ins Cytoplasma frei [Huber and Compton, 1998; Kinzler and Compton, 2005]. Die Infektion von Epithel- und Endothelzellen

erfolgt vermutlich durch Endocytose (Abb. 1.2, Schritt (2b)). Hierfür kommt ein Glykoproteinkomplex zum Einsatz, der aus gH, gL sowie aus den Glykoproteinen pUL128, pUL130 und pUL131 besteht. Es wird vermutet, dass dieser Komplex den Epithel- und Endothelzelltropismus von HCMV begründet.

Unter Ausnutzung der zellulären Transportmechanismen werden virale Kapside und Endosomen entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Abb. 1.2, Schritt (3)) [Ogawa-Goto et al., 2003]. Aus den Endosomen werden virale Kapside und Tegument über eine pH-abhängige Fusion der Virusmembran mit der endosomalen Membran ins Cytoplasma freigesetzt (Abb. 1.2, Schritt (4)) [Ryckman et al., 2006, 2008].

Durch die in der Kernmembran vorhandenen Kernporenkomplexe wird die DNA aus dem Kapsid in den Zellkern entlassen (Abb. 1.2, 5). Hier findet die virale Genexpression, die DNA-Replikation und der Zusammenbau neuer Kapside statt (Abb. 1.2, Schritt (6)). Die Expression der viralen Gene findet in einer kaskadenartigen Abfolge statt und kann in drei Abschnitte unterteilt werden: die *immediate early*- (IE), *early*- (E) und *late*- (L) Phase [Fortunato and Spector, 1999; Honess and Roizman, 1974]. Für die Transkription der IE-Gene ist keine *de novo*-Synthese viraler Proteine notwendig, sie erfolgt direkt nach der Infektion. IE-Genprodukte steuern als Transaktivatoren die virale und zelluläre Genexpression, greifen in den Zellzyklus ein und blockieren die Induktion der Apoptose sowie die Interferon-Antwort. Eine bedeutende Rolle spielt auch die Zerstörung der zellulären ND10 *domains* durch das IE1-Protein. Dieser Mechanismus wird in Kapitel 1.6.2 näher ausgeführt werden.

Produkte der *early*-Gene sind für die virale Replikation erforderlich, wie z.B. die virale DNA-Polymerase. Weitere in der *early*-Phase synthetisierte Proteine sind am Aufbau der Kapside beteiligt oder inhibieren zelluläre Abwehrmechanismen. Der Beginn der DNA-Replikation definiert den Anfang der *late*-Phase. *Late*-Genprodukte sind hauptsächlich Strukturproteine, die für die Bildung neuer Viruspartikel benötigt werden.

Die Replikation der viralen DNA findet in sogenannten Replikationskompartimenten statt, welche als nukleäre Einschlüsse im Zellkern HCMV-infizierter Zellen lichtmikroskopisch sichtbar sind. Hierbei kommt es durch die Replikation nach dem „rolling circle“-Mechanismus zur Bildung von Konkatameren viraler DNA. Beim Zusammenbau der neuen Kapside lagern sich fünf virale Kapsidproteine zu einem Prokapsid zusammen. In dieses Prokapsid wird über ein Portal-Protein die virale DNA eingefügt, die durch die virale Terminase von der konkatamerischen DNA abgetrennt wird [Holzenburg et al., 2009]. Dieser Schritt führt zur Bildung des Nukleokapsids.

Der Austritt der reifen Kapside aus dem Zellkern erfolgt über einen zweistufigen Prozess [Mettenleiter et al., 2006; Mocarski et al., 2007]. Die Kapside treten durch die innere Kernmembran, wobei sie von der Kernmembran umhüllt werden und in den perinukleären Raum knospen (Abb. 1.2, Schritt (7)). Durch Fusion der primären Virusmembran mit

der äußeren Kernmembran treten die Kapside ins Cytoplasma über. Hier findet die Anlagerung des Teguments an die Viruspartikel statt (Abb. 1.2, Schritt (8)). Von den 71 Proteinen, die bisher als Bestandteile von Viruspartikeln identifiziert wurden, sind mehr als die Hälfte Tegumentproteine, die übrigen Proteine bilden Bestandteile des Kapsids und der Virusmembran [Kalejta, 2008]. Die meisten dieser Tegumentproteine sind phosphoryliert. Bisher ist nicht geklärt, welche Bedeutung dieser Modifikation für die Bildung des Teguments zukommt. Weiterhin ist nicht bekannt, auf welche Weise virale Proteine für den Einbau in das Tegument gekennzeichnet werden. Es wurde bisher keine Sequenz identifiziert, die als Signal für eine Tegumentplatzierung dienen könnte. Vermutlich bestimmt die Phosphorylierung, die subzelluläre Lokalisation in der Nähe des „Assembly“-Kompartiments, die Interaktion mit Kapsid-Proteinen oder eine Interaktion mit dem cytoplasmatischen Anteil von Virusmembran-Proteinen die Integration eines Proteins in das Tegument. Neben viralen werden auch zelluläre Proteine in das Tegument neu entstehender Viruspartikel integriert, außerdem wurden auch virale und zelluläre RNAs als Tegumentbestandteile identifiziert [Terhune et al., 2004].

Tegument-Proteine üben in fast allen Phasen einer CMV-Infektion Funktionen aus. So sind Tegument-Proteine am Transport der Viruspartikel in der Zelle beteiligt (z.B. pUL47, pUL48), werden für die virale *immediate early*-Genexpression benötigt (z.B. pp71), dienen der Abwehr der zellulären Immunantwort (z.B. pp65) und spielen nicht zuletzt eine Rolle beim Zusammenbau und Austritt neuer Viruspartikel [Kalejta, 2008].

Es wird vermutet, dass die Integration der meisten Proteine in das Tegument im Cytoplasma stattfindet [Mettenleiter et al., 2006]. Hier akkumulieren Tegument-Proteine in der Nähe des Golgi-Apparates. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass sich ein Teil der Tegument-Proteine bereits im Zellkern an das Kapsid anlagert oder der Prozess der primären Umhüllung des Kapsids im perinukleären Raum zur Tegumentation beiträgt.

Nach Anlagerung der Tegument-Bestandteile an das Kapsid erfolgt die endgültige Umhüllung des tegumentierten Kapsids mit der zellulären Membran (Abb. 1.2, Schritt (9)). Es wird angenommen, dass sich virale Glykoproteine in die Membran von Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerks einlagern, in welche das tegumentierte Kapsid eindringt und hierbei seine endgültige Membranhülle erhält [Homman-Loudiyi et al., 2003]. Der Austritt der Viruspartikel aus der Zelle erfolgt in einer Weise, die der Exocytose von sekretorischen Vesikeln gleicht. Die Virus-beladenen Vesikel fusionieren mit der Plasmamembran und setzen die neu entstandenen Viren frei (Abb. 1.2, Schritt (10)) [Mettenleiter et al., 2006].

1.1.4 Das murine Cytomegalovirus (MCMV)

Aufgrund der Spezies-Spezifität der Cytomegaloviren ist es schwierig, Aspekte der Infektion und Pathogenese des humanen Cytomegalovirus zu untersuchen. Hierbei ist man größtenteils auf *in vitro*-Experimente mit primären humanen Zellen beschränkt. Aus diesem Grund wird das murine Cytomegalovirus als Tiermodell für eine Cytomegalovirus-Infektion verwendet. Sowohl die genetischen als auch die pathogenen Eigenschaften von HCMV und MCMV sind sehr ähnlich, so dass Ergebnisse, die mit Untersuchungen von MCMV gewonnen werden, einen hohen prädiktiven Wert für HCMV haben. Die Genomgröße und Anzahl der Open reading frames (ORF) ist für beide Virus-Stämme ähnlich [Rawlinson et al., 1996]. Beide CMV-Genome haben eine Größe von ca. 230 kbp und kodieren für ca. 170 ORFs. Hierbei befinden sich die Gene sowohl auf dem Plus- als auch auf dem Minusstrang der doppelsträngigen linearen DNA.

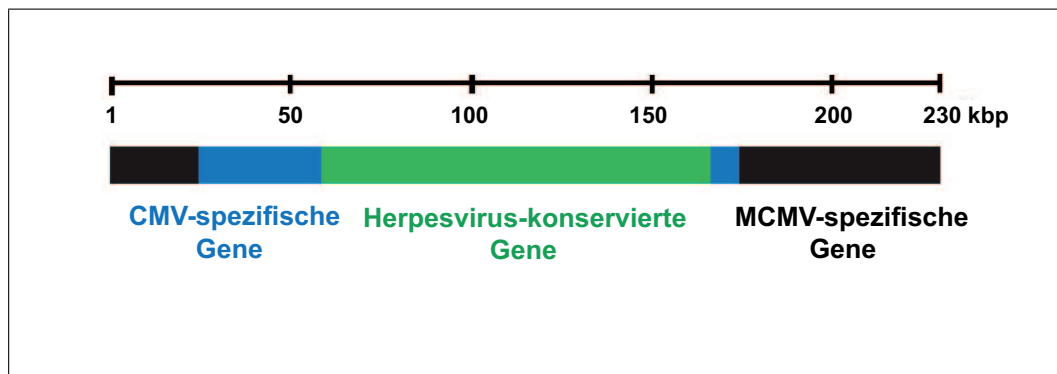


Abbildung 1.3 Organisation des MCMV-Genoms. Die für alle Mitglieder der Herpesviridae konservierten Gene befinden sich im Zentrum des MCMV-Genoms. Diese Region ist von Genen umgeben, die spezifisch für die β -Herpesfamilie sind. MCMV-spezifische Gene befinden sich an den äußeren Termini des Genoms. Das Genom hat eine Größe von ca. 230 kbp. Modifiziert nach Sengstake [2009].

Das MCMV-Genom besitzt Gene, die bei allen Herpesviren konserviert sind. Diese Gene befinden sich im zentralen Bereich des MCMV-Genoms (Abbildung 1.3) [Pellett and Roizman, 2007]. Die Anordnung und Orientierung dieser konservierten Genbereiche ist in HCMV und MCMV miteinander vergleichbar. Weiterhin befinden sich im MCMV-Genom Gene, die Homologe zu HCMV-Genen darstellen. Diese HCMV-Homologe flankieren den zentralen Bereich des MCMV-Genoms (Abbildung 1.3). In den Termini des MCMV-Genoms liegen dagegen Gene, die MCMV-spezifisch sind [Rawlinson et al., 1996]. In diesen Bereichen wurde eine gewisse Variabilität der DNA-Sequenzen zwischen einzelnen Virusisolaten festgestellt [Smith et al., 2006]. An den äußersten Enden des MCMV-Genoms befinden sich repetitive Sequenzen, die Signale für die Zerteilung der konkatamerischen DNA nach der Replikation und für die Verpackung des Genoms in das virale Kapsid enthalten.

Eine Reihe von MCMV-Genen zeigt eine Ähnlichkeit zu zellulären Genen. Dies deutet darauf hin, dass diese Gene während der Ko-Evolution mit dem Wirtsorganismus in das MCMV-Genom integriert wurden [Davison and Bhella, 2007]. Zu diesen Wirtszell-Homologen gehören Gene für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Chemokin-Rezeptoren und Chemokin-Homologe sowie ein MHC-Klasse I-*heavy chain* Homolog [Davis-Poynter et al., 1997; Chapman and Bjorkman, 1998].

Eine Infektion mit CMV erfolgt in den meisten Fällen über Kontakt von Schleimhaut-Epithelien mit infektiösen Viruspartikeln. In Rhesus-Affen, die mit Rhesus-CMV infiziert wurden, wurde gezeigt, dass das Virus in diesen Epithelzellen repliziert und anschließend auf andere Organe, wie Milz und Leber, übergreift [Lockridge et al., 1999]. Für MCMV wurde eine Infektion von Leukocyten nach intraperitonealer Infektion nachgewiesen. Über den Blutstrom erreicht und infiziert das Virus dann Organe wie Leber und Milz [Collins et al., 1994].

Der Verlauf der MCMV-Infektion beginnt mit einer akuten Phase der Virusreplikation in Leber und Milz infizierter Tiere, die bis zu 16 Tage nach Infektion andauern kann [Mercer and Spector, 1986]. Auch in den Speicheldrüsen ist eine starke Virusreplikation festzustellen. Nach dieser akuten Phase der Infektion kommt es zu einer Abnahme der viralen Titer in den betroffenen Organen. Nur in den Speicheldrüsen können auch lange nach Beginn der Infektion (> 4 Monate) noch infektiöse Viruspartikel nachgewiesen werden [Baltesen et al., 1993].

Nach Einsetzen der Latenz-Phase ist die Detektion infektiöser Viruspartikel nicht mehr möglich. Während der Latenz ist die virale Genexpression auf ein Minimum beschränkt. Es werden vermutlich nur noch Proteine synthetisiert, die für die stabile Erhaltung der Genome in latent infizierten Zellen benötigt werden. Für die Aufrechterhaltung der latenten Infektion sind zwei Mechanismen denkbar. Zum einen könnten virale Genome durch Teilung der Wirtszelle auf die Tochterzellen weitergegeben werden, was aber voraussetzt, dass auch die virale DNA in mindestens zwei Kopien in der Zelle vorliegt. Zum anderen könnte es zu lokalen, symptomlosen Reaktivierungen kommen, in denen das Virus aktiv repliziert und weitere Zellen infiziert. Welcher Mechanismus zur Erhaltung der Latenz beiträgt, ist jedoch bisher unklar.

1.2 Viral induzierte Veränderungen des Cytoskeletts

1.2.1 Aufbau und Regulation des Aktin-Cytoskeletts

Die räumliche Struktur, Position und mechanische Stabilität von Zellen beruht auf Filamentsystemen. Dieses als Cytoskelett bezeichnete System ermöglicht es Zellen, gerichtet Moleküle im Zellinneren zu transportieren, sich zu teilen und auf Umweltreize zu reagieren.

Das Cytoskelett weist eine hohe Dynamik auf und ist in der Lage, seine Struktur in kurzer Zeit umzubilden, um damit auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren [Alberts et al., 2004]. Die vielfältigen Funktionen des Cytoskeletts gründen auf Eigenschaften von drei Proteinfamilien, die sich zu drei Filamenttypen zusammenfügen. Jeder Filamenttyp verfügt über charakteristische mechanische Eigenschaften.

Intermediärfilamente bieten der Zelle mechanische Festigkeit und sind aus der großen und uneinheitlichen Familie der Intermediärfilament-Proteine aufgebaut. Eine Art der Intermediärfilamente bildet z.B. die Kernlamina, die unmittelbar unterhalb der Kernmembran liegt [Alberts et al., 2004]. Mikrotubuli bestimmen die Lage membranumschlossener Organellen und leiten den intrazellulären Transport [Alberts et al., 2004]. Sie bestehen aus dem Protein Tubulin. Mit einem Ende sind diese langen und starren Filamente meist im Mikrotubuli-organisierenden Zentum (MOC) befestigt.

Aktinfilamente sind zweisträngige helikale Polymere, die sich aus Monomeren des Proteins Aktin zusammensetzen. Sie bilden flexible Strukturen mit einem Durchmesser von fünf bis neun Nanometern, die zu linearen Bündeln, flächigen Netzen und räumlichen Gelen organisiert sind. Hier sind die Proteine Villin und alpha-Actinin für eine Quervernetzung sowie das Protein Spectrin für eine Netzbildung von Aktinfilamenten verantwortlich. Über das Bündelprotein Myosin II erhalten Aktinstressfasern zudem die Fähigkeit sich zusammenzuziehen [Alberts et al., 2004]. Aktinfilamente legen die Form der Zelle fest und sind für die Zellbewegung erforderlich. Die Entstehung von Aktinfilamenten wird häufig durch äußere Signale kontrolliert, wodurch es der Zelle möglich wird, ihre Form und Festigkeit rasch Änderungen in der äußeren Umwelt anzupassen. Sie haben die wichtige Funktion, interne Strukturen einer Zelle mit der sie umgebenden Umwelt, z. B. anderen Zellen oder der extrazellulären Matrix, zu verbinden.

Die Bildung von Aktinfilamenten wird durch intrazelluläre Signalmoleküle an der Plasmamembran kontrolliert, dabei wird die Keimbildung durch den ARP-Komplex (Actin related protein) an der Plasmamembran katalysiert [Goley and Welch, 2006]. Die Anlagerung von löslichen Aktinmolekülen an entstehende Filamente wird durch die Bindung von Aktinmonomeren an Thymosin und Profilin reguliert. Während an Thymosin gebundene Aktinmonomere sterisch an der Bindung an Aktinfilamente gehindert werden, beschleunigen an Profilin gebundene Aktinmonomere den Aufbau von Aktinfilamenten [Pollard and Cooper, 2009]. Das direkt an Aktinfilamente bindende Protein Cofilin destabilisiert Aktinpolymere, wodurch die Geschwindigkeit des Umbaus von Aktinfilamenten gesteigert wird. In vielen Zellarten wird die Befestigung der Aktinfilamente an die Plasmamembran durch eine Familie nahe miteinander verwandter Proteine vermittelt, den ERM-Proteinen (Ezrin, Radixin, Moesin) [Tsukita and Yonemura, 1999]. ERM-Proteine binden mit ihrer C-terminalen Domäne an Aktinfilamente und mit ihrer N-terminalen Domäne an den cytosolischen Anteil verschiedener Transmembran-Glykoproteine. Sie können in einer aktiven,

phosphorylierten Konformation, die an Aktin und Membranproteine bindet, und in einer inaktiven, nicht phosphorylierten Konformation vorliegen. Intra- und extrazelluläre Signale können eine Phosphorylierung inaktiver ERM-Proteine auslösen und ermöglichen damit der Zelle, die durch ERM-Proteine vermittelten Kontakte zwischen Aktinfilamenten und der extrazellulären Matrix zu regulieren.

1.2.2 Fokalkontakte

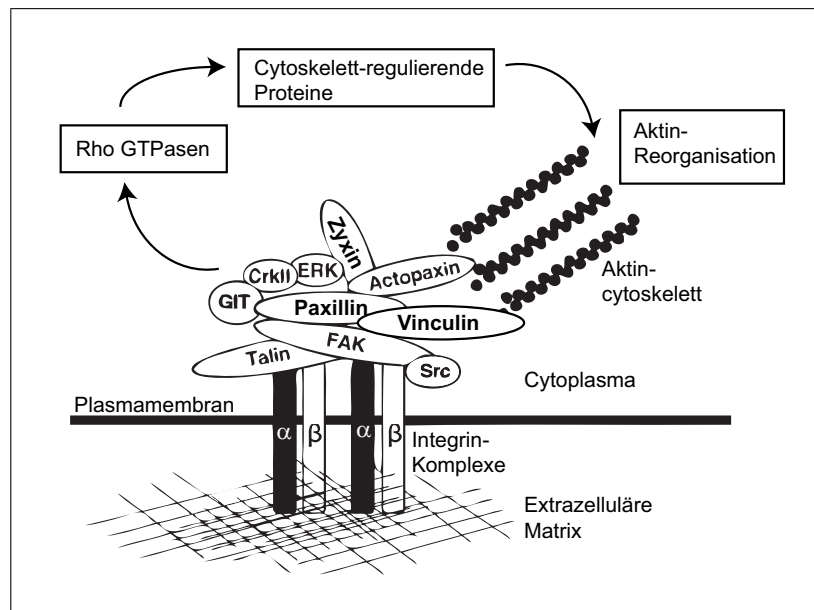


Abbildung 1.4 Vereinfachtes Modell der Cytoskelett-Reorganisation durch Fokalkontakte. Fokalkontakte vermitteln die strukturelle Verbindung und den Signaltransfer zwischen extrazellulärer Matrix und Aktin-Cytoskelett. Bestandteile der Fokalkontakte sind Signalmoleküle (z.B. ERK- und FAK-Kinasen), Aktin-polymerisierende Proteine (z.B. Zyxin) und Aktin-vernetzende Proteine (z.B. Vinculin). Modifiziert nach Deakin and Turner [2008].

Fokalkontakte stellen hochspezialisierte Verankerungspunkte zwischen Aktinfilamenten und der extrazellulären Matrix dar [Burridge et al., 1988]. Neben ihrer Funktion als Anker für die Zelle können Fokalkontakte auch Signale von der extrazellulären Matrix auf die Innenseite der Zelle übertragen [Jockusch et al., 1995]. Die aus kontraktile Bündeln von Aktin- und Myosin II-Filamenten bestehenden Stressfasern enden an den Fokalkontakten, in denen sich transmembrane Adhäsionsproteine, sogenannte Integrine, befinden. Integrine bilden eine große Familie heterodimerer Proteine, die an unterschiedliche Substrate der extrazellulären Matrix binden. Die Verknüpfung von Integrinen mit Aktinfilamenten erfolgt über einen Komplex aus diversen intrazellulären Ankerproteinen.

Die Interaktion zwischen den Fokalkontakten und dem Aktin-Cytoskelett ist bidirektional. Kräfte, die durch Aktinstressfasern aufgebaut werden, regulieren die Bildung von Fokalkontakten. Andererseits können auch Fokalkontakte die Keimbildung von Aktinfilamenten induzieren. Hierfür sind Aktin-polymerisierende Proteine, wie z.B. Zyxin, verantwortlich, welches die Aktinpolymerisation in Fokalkontakten reguliert. In den Fokalkontakten steuert eine Vielzahl von Signal-Proteinen unter anderem die Zellmotilität. In Abbildung 1.4 wird die Bedeutung des Proteins Paxillin dargestellt, welches eine zentrale Rolle bei der Signalvermittlung einnimmt. Vier Zinkfinger-Motive im C-terminalen Bereich des Proteins vermitteln Protein-Protein-Interaktionen und dienen als Bindestellen für Proteine, die die Bildung von Fokalkontakten kontrollieren [Brown 1996]. Dagegen liegen im N-terminalen Bereich des Paxillin-Proteins Phosphorylierungsstellen vor, die Ziele für viele Kinasen bieten, welche durch Adhäsionsstimuli und Wachstumsfaktoren aktiviert werden können. Zu den Kinasen, die Paxillin phosphorylieren, gehören die p21-aktivierte Kinase (PAK) [Nayal et al., 2006], die *Focal-adhesion* Kinase (FAK) [Thomas et al., 1999], ERK (*extracellular-signal-related kinase*) [Ishibe et al., 2003] und CDK5 (*cyclin-dependent kinase 5*) [Miyamoto et al., 2007].

Paxillin ist zudem in die Signalvermittlung durch Rho GTPasen involviert. Zentrale Regulatoren des Cytoskeletts sind die Rho GTPasen Cdc42, Rac und RhoA. Sie dienen als molekulare Schalter, die zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen, und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand wechseln [Alberts et al., 2004]. Der Übergang von der aktiven in die inaktive Form wird von einer Phosphorylierung der GTPasen begleitet, was eine Aktivierung unterschiedlicher Effektor-Moleküle zur Folge hat. Diese Effektor-Moleküle initiieren Signal-Wege, die letztlich eine Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts auslösen können. Die Aktivierung von Cdc42 löst die Polymerisation von Aktin und eine Bündelung von Aktinfilamenten aus, so dass Filopodien und andere Zellausstülpungen gebildet werden. Die Aktivierung von Rac fördert die Aktinpolymerisation am Zellrand, was zur Bildung von blattartigen Lamellipodien und Membranfalten führt. Die Aktivierung von RhoA begünstigt sowohl die Bildung von Stressfasern als auch die Zusammenlagerung von Integrinen und weiteren Proteinen zu Fokalkontakten. Der RhoA-Signalweg wirkt generell den Rac- und Cdc42-Signalwegen entgegen [Deakin and Turner, 2008].

1.2.3 Manipulation des Cytoskeletts durch Viren

Viren haben eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, die Komponenten des Cytoskeletts zu ihren Vorteilen zu nutzen. Dies geschieht in allen Stadien des viralen Replikationszyklus, beim Zelleintritt, dem Transport der Viruspartikel innerhalb der Zelle, dem Zusammenbau und beim Verlassen der Zelle. Eine wichtige Rolle spielt die Modifikation des Cytoskeletts auch bei der Infektion benachbarter Zellen sowie bei der Verteilung des Virus innerhalb

von Geweben bzw. im gesamten Organismus [Gouin et al., 2005]. Insbesondere von Herpesviren, aber auch von anderen Viren, werden Mikrotubuli genutzt, um das Viruskapsid nach Eintritt in das Cytoplasma zum Zellkern zu transportieren [Radtke et al., 2006].

Nach einer Infektion mit Vaccinia Virus, einem Mitglied der Familie der Poxviridae, wird durch das virale F11L-Protein eine gesteigerte Motilität infizierter Zellen induziert. Hierbei bindet das F11L-Protein direkt an RhoA und inhibiert den RhoA-Signalweg, was zu einer erhöhten Dynamik der Mikrotubuli-Polymerisation führt [Arakawa et al., 2007]. Dieser Vorgang beschleunigt den Transport der intrazellulären Viruspartikel und führt zu einer erhöhten Infektivität. Weiterhin induziert Vaccinia Virus die Polymerisation von Aktin an intrazellulären Viruspartikeln. Hierdurch werden die Partikel innerhalb und außerhalb infizierter Zellen aktiv vorwärts bewegt [Cudmore et al., 1995].

Einige Viren induzieren die Bildung von Zellfortsätzen. Dies wurde unter anderem bei Vaccinia Virus-, Epstein-Barr Virus (EBV)- und Pseudorabies Virus (PRV)-infizierten Zellen beobachtet [Sanderson et al., 1998; Loesing et al., 2009; Favoreel et al., 2005]. In EBV-infizierten Zellen wird dieser Vorgang vermutlich durch die viralen Proteine BDLF2 und BMRF2 ausgelöst, die in den RhoA-Signalweg eingreifen.

In PRV-infizierten Zellen erfolgt eine Phosphorylierung der p21-aktivierten Kinase PAK1 durch die virale Kinase US3 [den Broeke et al., 2009]. p21-aktivierte Kinasen sind Regulatoren der Cdc42-Signalvermittlung. Die Phosphorylierung von PAK1 durch US3 führt zur Ausbildung von Zellfortsätzen, an deren äußerer Spitze Viruspartikel detektiert wurden. Durch die Ausbildung dieser Zellfortsätze könnte die Weiterverbreitung von Viruspartikeln in benachbarte Zellen begünstigt werden. Zusätzlich interagiert die virale Kinase US3 mit der p21-aktivierten Kinase PAK2, was zu einer Zerstörung von Aktinstressfasern in PRV-infizierten Zellen führt. *In vitro* zeigen PRV-infizierte Zellen entweder die Ausbildung von Zellfortsätzen oder einen Abbau der Stressfasern, je nachdem, ob die Zellen einzelt oder in einem Zellverbund vorliegen. Inwiefern diese Prozesse *in vivo* eine Rolle für die Ausbreitung des Virus spielen, ist noch nicht geklärt. Es wurde jedoch gezeigt, dass durch eine Deletion der US3-Kinase die Ausbreitung des Virus *in vitro* vermindert wurde [Favoreel et al., 2005].

Andere Viren induzieren eine Abrundung infizierter Zellen. Hierdurch geht der Kontakt zur extrazellulären Matrix verloren und die Zellen lösen sich ab. Das Ebola-Virus, welches zur Familie der Filoviridae gehört, kodiert für ein auf der Zelloberfläche exprimiertes Glykoprotein (GP), welches die Expression der an der Zelloberfläche befindlichen β -Integrin-Moleküle vermindert und so die Abrundung infizierter Zellen bewirkt [Francica et al., 2009]. Es wird vermutet, dass die verringerte Integrin-Expression die Detektion infizierter Zellen durch Immunzellen erschwert. So spielen Integrine bei der Orientierung von Leukocyten zum Ort der Infektion eine bedeutende Rolle [Butcher, 1991]. Außerdem könnten auch die hämorrhagischen Symptome einer Ebola-Infektion durch eine Glykoprotein-

induzierte Ablösung und Verteilung infizierter Zellen im Blutstrom hervorgerufen werden [Sullivan et al., 2005].

1.2.4 Modifizierung des Aktin-Cytoskeletts durch Cytomegaloviren

Auch in Cytomegalovirus-infizierten Zellen erfolgt eine Modifizierung des Cytoskeletts, die sich in der Ausbildung des typischen cytopathischen Effekts der Zellabrundung zeigt. Dagegen ist die Ausbildung von Zellfortsätzen in den üblicherweise als Wirtszellen genutzten Fibroblasten, aber auch in anderen Zelltypen (Epithelzellen) *in vitro* nicht zu beobachten. In HCMV-infizierten Fibroblasten beginnt die Abrundung der Zellen fünf bis sechs Stunden nach der Infektion, und geht mit einer Zerstörung der Aktinfilamente einher [Furukawa et al., 1973; Albrecht et al., 1980; Jones et al., 1986]. Zur Abrundung der Zellen ist eine *de novo*-Synthese von *immediate early*- oder *early*-Virusproteinen notwendig. Wird die Transkription oder die Proteinsynthese durch spezifische Inhibitoren blockiert, tritt dieser cytopathische Effekt nicht auf [Furukawa et al., 1973; Albrecht et al., 1983]. Auch UV-inaktivierte Viruspartikel induzieren keine Zellabrundung [Hirai et al., 1977].

In HCMV-infizierten Zellen ist eine Verringerung der Expression von $\alpha 1/\beta 1$ -Integrinen zu beobachten [Warren et al., 1994]. Da Integrine die Verbindung des Cytoskeletts zur extrazellulären Matrix vermitteln, könnte dies zu einem Verlust der zellulären Adäsion führen. Es wird vermutet, dass ein virales Protein die Expression der $\alpha 1/\beta 1$ -Integrine inhibiert. Dieses Protein könnte durch das IRS1-Gen kodiert sein, welches einen transkriptionellen Transaktivator darstellt. HCMV-Mutanten, denen das IRS1-Gen fehlt, sind nicht mehr in der Lage, eine Abrundung infizierter Zellen zu induzieren [Jones and Muzithras, 1992].

Neben der verminderten Expression von Integrinen wird während einer HCMV-Infektion auch die Expression Fokalkontakt-assoziiierter Proteine verringert und die Fokalkontakte werden zerstört [Stanton et al., 2007]. Die Expression der Proteine Connexin43, Paxillin und Hic-5, die mit Fokalkontakten assoziiert sind, wird verringert, und die Lokalisation verändert sich zugunsten einer cytoplasmatischen Verteilung dieser Proteine.

Mit dem Protein pUL37x1 wurde ein weiterer viraler Faktor identifiziert, der eine Abrundung HCMV-infizierter Zellen induziert. Das Protein UL37x1, das auch als vMIA (*viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis*) bezeichnet wird, lokalisiert in der Nähe der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und von Mitochondrien. Ursprünglich wurde das pUL73x1-Protein als Apoptose-Inhibitor beschrieben, der die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien verhindert. Durch die Lokalisierung an der ER-Membran induziert pUL37x1 vier bis sechs Stunden nach der Infektion eine Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER ins Cytosol, die mit einer Zerstörung der Aktinfilamente einhergeht [Poncet et al., 2006; Sharon-Friling et al., 2006]. Die Zellen runden sich ab

und schwellen dabei an. Der Mechanismus, durch den die Ca^{2+} -Freisetzung die Aktinreorganisation in infizierten Zellen auslöst, ist jedoch nicht bekannt. Es könnte sein, dass Ca^{2+} -abhängige Aktin-Kofaktoren, wie z.B. Gelsolin, durch die Ca^{2+} -Freisetzung aktiviert werden und zur Zersetzung von Aktinfilamenten beitragen.

Die *in vivo*-Relevanz der Virus-induzierten Zellabrundung ist unklar. Eine Folge könnte eine bessere Verteilung von Viruspartikeln auf benachbarte Zellen sein. HCMV-infizierte Zellen könnten sich durch die Abrundung aus Gefäßwänden herauslösen und über den Blutstrom Viruspartikel in periphere Regionen verteilen. So wurden zum Beispiel in immunsupprimierten Patienten mit symptomatischen oder asymptomatischen HCMV-Erkrankungen zirkulierende HCMV-infizierte Endothelzellen (CCIC, *circulating CMV-infected endothelial cells*) im Blut nachgewiesen [Percivalle et al., 1993; Salzberger et al., 1997]. Auch die Möglichkeit, dass HCMV-infizierte Zellen durch ihre Abrundung Epithel- oder Endothelgewebe permeabilisieren und so die Verteilung des Virus begünstigen, wird in Betracht gezogen.

In MCMV-infizierten Zellen ist der cytopathische Effekt noch ausgeprägter als in HCMV-infizierten Zellen. *In vitro* beginnt dieser Prozess bereits vier Stunden nach Infektion und führt zu einer vollständigen Abrundung der infizierten Zellen. Die Abrundung geht mit einem Verlust der Adhäsion an die Zellkultur-Oberfläche einher. Für die Induktion des cytopathischen Effekts in MCMV-infizierten Zellen sind Genprodukte des M25 *Open Reading Frames* verantwortlich [Sengstake, 2009].

1.3 Induktion des cytopathischen Effekts durch MCMV M25-Genprodukte

1.3.1 Induktion der Zellabrundung

Der cytopathische Effekt der Zellabrundung wird in MCMV-infizierten Zellen durch Genprodukte des M25 *Open reading frames* ausgelöst [Sengstake, 2009]. Abbildung 1.5 (oben) zeigt die Auswirkungen einer MCMV-Infektion auf die Morphologie und die Struktur des Aktin-Cytoskeletts infizierter Fibroblasten. Infizierte Zellen sind anhand ihrer GFP-Expression zu identifizieren. Die Zellabrundung setzt ca. vier Stunden nach Infektion ein. Bereits fünf Stunden nach Infektion ist ein Abbau von Aktinstressfasern zu beobachten und die Aktinfilamente konzentrieren sich vornehmlich am Zellkortex. Mit Fortschreiten der Infektion nimmt die Abrundung der Zellen zu. 24 Stunden nach Infektion liegt ein Großteil der infizierten Zellen vollständig abgerundet vor, wobei die Aktinfilamente als Ring im Bereich des Zellkortex vorliegen. Im Zuge der Abrundung verkleinert sich der

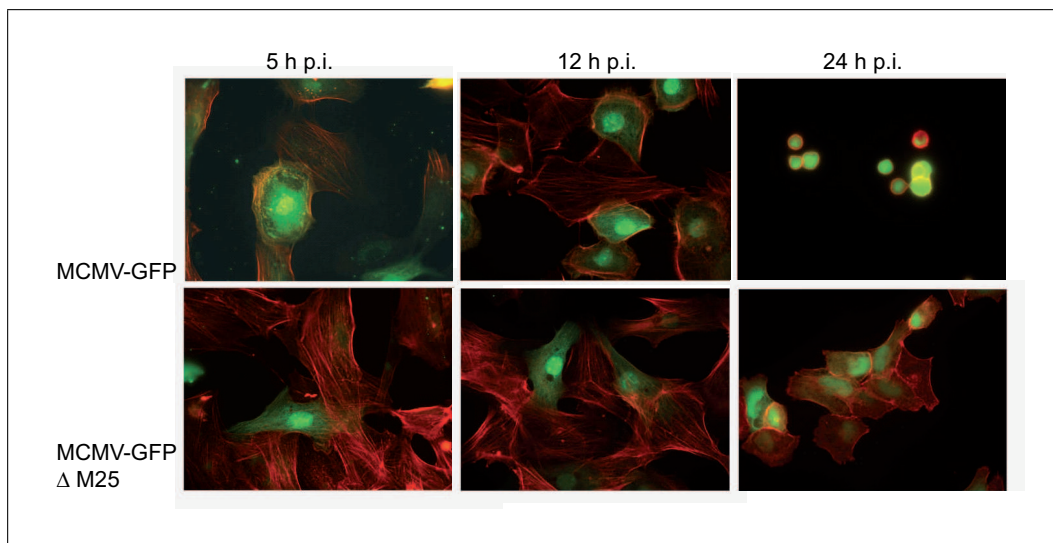


Abbildung 1.5 Zellmorphologie während einer MCMV-Infektion. Murine Fibroblasten, die mit MCMV-GFP infiziert wurden, runden sich im Verlauf der Infektion ab (oben). Die mit einer M25-Deletionsmutante infizierten Zellen behalten ihre ausgestreckte Form bei. Das Aktin-Cytoskelett wurde mit Phalloidin-TRITC gefärbt, infizierte Zellen exprimieren GFP. Modifiziert nach Sengstake [2009].

Zelldurchmesser eklatant und auch der Kontakt zur extrazellulären Matrix verringert sich, so dass die Zellen sich *in vitro* leicht von ihrer Kulturoberfläche ablösen.

Eine Infektion mit einer M25-Deletionsmutante führt dagegen nicht zur Abrundung der Zellen (Abbildung 1.5, unten). Die Zellen behalten ihre ausgestreckte Form bei. Auch zu späten Zeitpunkten der Infektion weisen die infizierten Zellen eine Form auf, die der nicht infizierter Fibroblasten gleicht. Durch eine Reinsertion des M25 ORFs in eine M25-Deletionsmutante wurde bestätigt, dass der Effekt der Zellabrundung spezifisch von der Anwesenheit des M25 ORFs im Genom abhängt. Nach Reinsertion des M25 ORFs zeigen infizierte Zellen wieder eine Wildtyp-ähnliche Veränderung ihrer Morphologie [Sengstake, 2009].

Der M25 ORF weist eine Größe von 932 bp auf und liegt auf dem Plus-Strang des MCMV-Genoms. Der C-Terminus der M25-Aminosäuresequenz weist eine Homologie zu den HCMV-kodierten UL25- und UL35-Proteinen auf, welche die UL25 Genfamilie bilden. In der im Anhang dargestellten M25-Aminosäuresequenz wurde dieser konservierte Bereich gekennzeichnet. Es wurde bereits untersucht, ob diese konservierte Region für die Induktion der Zellabrundung durch MCMV ausreichend ist. MCMV-Mutanten, die entweder nur den konservierten C-Terminus oder nur den MCMV-spezifischen N-Terminus der Aminosäuresequenz exprimierten, waren nicht in der Lage, den beschriebenen cytopathischen Effekt auszulösen. Für die Auslösung der morphologischen Änderungen durch M25-Genprodukte sind demnach beide Teile des M25 ORFs essentiell [Sengstake, 2009].

1.3.2 M25-Transkription und -Proteinsynthese

Im M25 ORF befinden sich 10 potentielle Startcodons, welche die Synthese möglicher M25-Genprodukte initiieren könnten. In der Tat werden durch den M25 ORF mehrere Proteine unterschiedlicher Größe synthetisiert [Farrell and Shellam, 1990; Wu et al., 1999; Sengstake, 2009]. Zu frühen Zeitpunkten der Infektion wird ein Protein mit einer molekularen Masse von ca. 105 kDa in größerer Menge synthetisiert (Abbildung 1.6). Vermutlich wird dieses 105 kDa-Protein zu frühen Zeitpunkten der Infektion *de novo* von einem frühen Transkript synthetisiert.

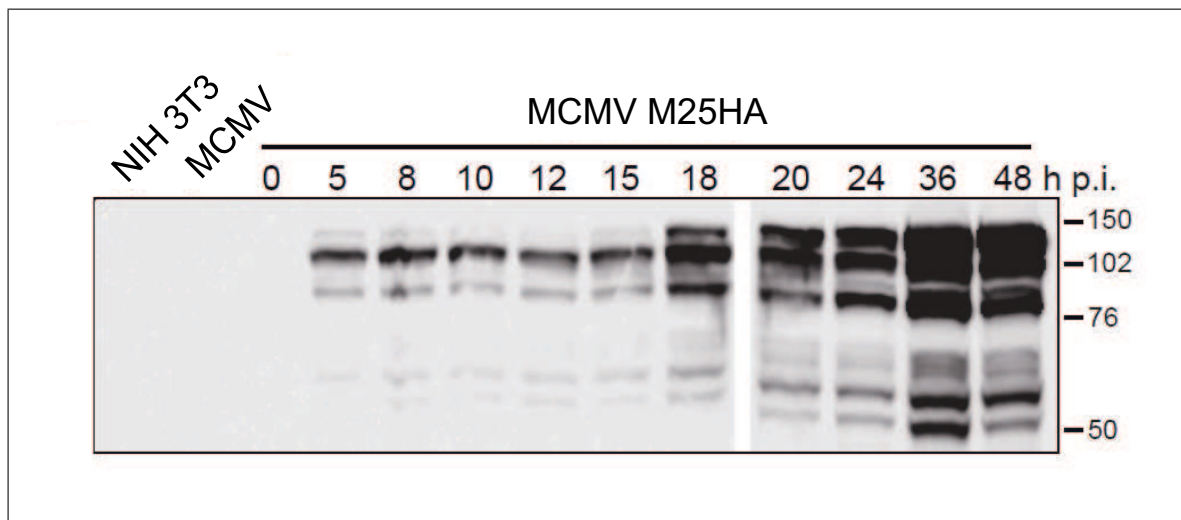


Abbildung 1.6 Kinetik der M25-Expression. Während der MCMV-Infektion werden verschiedene M25-Proteine synthetisiert. Ein 105 kDa-Protein wird zu frühen, ein 130 kDa-Protein erst zu späteren Zeitpunkten synthetisiert. Zudem sind Proteine mit geringerer molekularer Masse detektierbar. Die M25-Proteine wurden mittels einer C-terminalen HA-Markierung detektiert. Modifiziert nach Sengstake [2009].

Gleichzeitig werden zu frühen Zeitpunkten auch Proteine mit einer Größe von ca. 80 kDa und ca. 130 kDa in geringeren Mengen detektiert. Das 130 kDa-Protein, sowie zwei kleinere Proteine wurden als Bestandteile des viralen Teguments identifiziert [Wu et al., 1999; Kattenhorn et al., 2004], so dass die früh detektierte schwache 130 kDa-Bande vermutlich das vom Virus in die Zelle mit eingebrachte Protein darstellt.

18 Stunden nach Infektion erhöht sich die Expression sämtlicher M25-Proteine, insbesondere die des 130 kDa-Proteins. Mehrere M25-Proteine waren während des gesamten MCMV-Infektionszyklus nachzuweisen. Die Präsenz von M25-Proteinen zu frühen Zeitpunkten der Infektion deutet darauf hin, dass M25-Proteine an der zu diesem Zeitpunkt stattfindenden Induktion der Zellabrundung beteiligt sind.

Im Verlauf einer MCMV-Infektion werden zwei unterschiedliche RNA-Transkripte durch den M25 ORF gebildet [Dallas et al., 1994; Zhan et al., 2000; Sengstake, 2009]. Ein 2,8 kb

großes Transkript konnte nach fünf Stunden, ein zweites ca. 3,1 kb großes Transkript konnte 24 Stunden nach Infektion in MCMV-infizierten Zellen identifiziert werden. Beide Transkripte besitzen identische 3'-Enden, unterschieden sich jedoch in ihren 5'-Enden. In Abbildung 1.7 B sind die beiden detektierten M25-Transkripte schematisch dargestellt. Stromaufwärts vom 5'-Ende des größeren RNA-Transkripts wurde eine TATA-Box identifiziert, stromabwärts des 3'-Endes beider RNA-Transkripte befindet sich ein poly(A)-Signal.

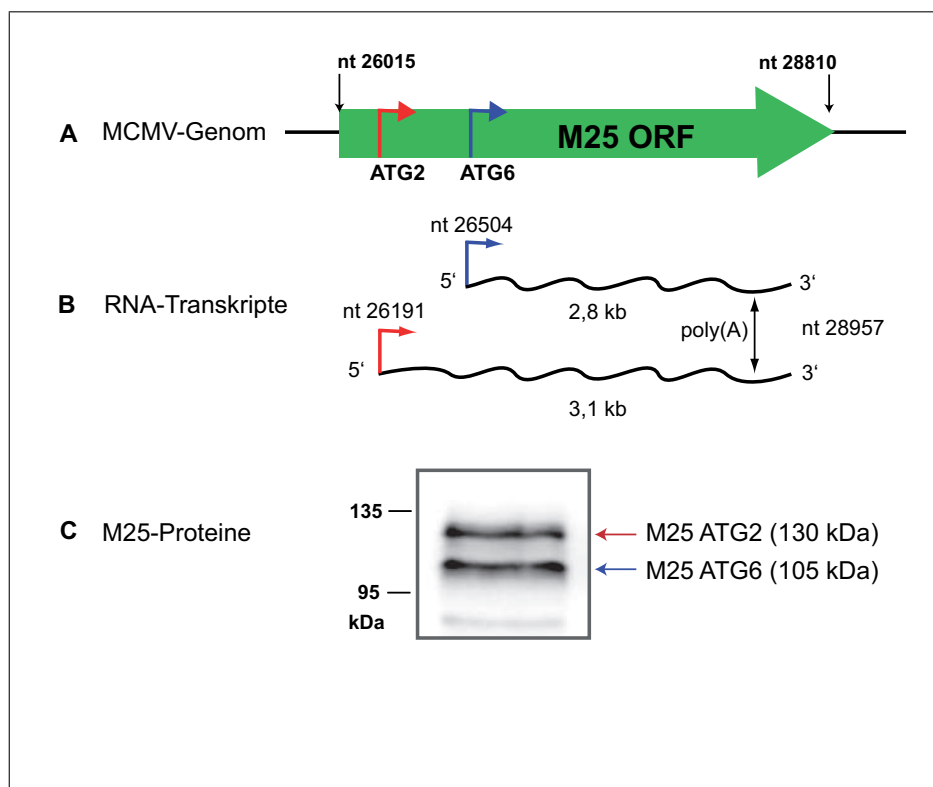


Abbildung 1.7 Synthese der M25-Proteine. A) Der M25 ORF beinhaltet mehrere Startcodons, u. a. ATG2 und ATG6. Die Position des M25 ORFs im MCMV-Genom ist in nt (nucleotides) angegeben. B) Zwei M25-Transkripte werden während der Infektion hergestellt. Beide Transkripte besitzen ein identisches 3'-Ende. C) Expression der Proteine, die durch ATG2 und ATG6 synthetisiert werden. Das M25-ATG2-Protein besitzt eine molekulare Masse von ca. 130 kDa, das M25-ATG6-Protein ist ca. 105 kDa groß. Modifiziert nach Sengstake [2009].

Vom 5'-Ende stromabwärts betrachtet, stellt das zweite ATG im M25 ORF das erste potentielle Startcodon des 3,1 kb RNA-Transkripts dar. Ein potentielles Startcodon für die Initiation der Translation des 2,8 kb RNA-Transkripts stellt das sechste ATG im M25 ORF dar, da dieses ATG das erste Startcodon ist, welches sich stromabwärts vom 5'-Ende dieser RNA befindet. Durch schrittweise Verkürzung des M25 ORFs in einem Expressionsplasmid wurde gezeigt, dass das 130 kDa-Protein durch das zweite ATG im

M25 ORF (M25-ATG2) und das 105 kDa-Proteins (M25-ATG6) durch das sechste ATG im M25 ORF initiiert wird (Abbildung 1.7 A, C). Weitere kleinere Proteinspezies werden vermutlich durch das siebte, neunte und zehnte ATG im M25 ORF synthetisiert. Die Positionen der relevanten Startcodons sind in der M25-Aminosäuresequenz im Anhang gekennzeichnet.

1.4 Cytomegaloviren und das Interferonsystem

1.4.1 Das Interferonsystem

Das Interferonsystem stellt die erste Linie der antiviralen Abwehr der Zelle dar. Zur Kontrolle einer CMV-Infektion ist das Interferonsystem neben der zellulären Immunantwort von essentieller Bedeutung [Mocarski, 2002]. Als Interferone (IFNs) werden bestimmte Cytokine bezeichnet, die antivirale Eigenschaften aufweisen. Neben der Inhibition der viralen Genexpression sind Interferone auch an der Regulation von Zellwachstum und Immunaktivierung beteiligt und bilden so eine Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem.

Interferone werden in zwei Klassen unterteilt, TypI-Interferone (α/β -Interferone) und TypII-Interferone (γ -Interferon). Die TypI-IFN-Produktion wird durch die Erkennung von Virusbestandteilen über Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) oder cytoplasmatische Sensoren induziert. Während IFN β von den meisten Zelltypen, u.a. in Fibroblasten, hergestellt wird [Erlandsson et al., 1998], wird IFN α hauptsächlich in Leukocyten exprimiert. Nach Stimulation durch IFN β produzieren allerdings auch andere Zelltypen IFN α .

Die TypI-IFN-Antwort auf eine virale Infektion kann in drei Phasen eingeteilt werden. TLRs an der Zelloberfläche oder in Endosomen erkennen Virusbestandteile und aktivieren Transkriptionsfaktoren, die für die IFN β -Produktion benötigt werden. Der IFN β -Promotor wird durch die Transkriptionsfaktoren aktiviert und leitet die Synthese und anschließende Sekretion von IFN β ein.

In der zweiten Phase erfolgt eine Signalkaskade, die durch die Bindung von IFN β an den IFN α/β -Rezeptor (IFNAR) ausgelöst wird. Durch den JAK-STAT-Signalweg kommt es zur Aktivierung der cytosolischen Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 [Kisseleva et al., 2002] und zur Bildung eines Proteinkomplexes, der an *Interferon stimulated response elements* (ISRE) in zellulären Promotoren bindet. Diese Interferon-stimulierten Gene (ISGs) kodieren für Proteine mit direkter antiviraler Wirkung und für Proteine, die als Transkriptionsfaktoren oder Sensoren für die Virusinfektion (z.B. TLRs) zur Verstärkung der IFN-Antwort beitragen [Randall and Goodbourn, 2008].

Mit der Transkription antiviraler Gene wird die dritte Phase der TypI-IFN-Antwort eingeleitet. Zu den Proteinen mit direkten antiviralen Funktionen gehören die Proteinkinase R

(PKR) und die Oligoadenylat-Synthase (OAS) [Samuel, 2001]. Diese werden durch die Anwesenheit doppelsträngiger RNA (dsRNA) im Cytoplasma aktiviert. dsRNA tritt bei fast allen RNA- und DNA-Viren als Genombestandteil, Replikationsintermediat oder durch die Transkription überlappender Gene auf [Weber et al., 2006]. Die PKR ist eine Serin-Threonin-Proteinkinase, welche die virale Proteinsynthese inhibiert. Die Bildung von Oligoadenylaten durch die OAS bewirkt den selektiven Abbau einzelsträngiger RNAs und trägt so zur Inhibierung der Proteinsynthese bei.

Die TypII-IFN-Antwort wird durch die Erkennung Virus-infizierter Zellen durch $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphocyten und NK-Zellen (*Natural killer cells*) eingeleitet. Hierbei kommt es zu einer Induktion der $IFN\gamma$ -Produktion und -Sekretion. Durch Bindung von $IFN\gamma$ an den $IFN\gamma$ -Rezeptor (IFNGR) infizierter Zellen erfolgt die Bildung des Transkriptionsfaktors GAF (*gamma acitvated factor*) und dessen Bindung an spezifische Sequenzen der zellulären DNA (GAS, *gamma activated sequences*). GAS-induzierte Promotoren kontrollieren die Expression weiterer antiviraler Proteine und die Expression von Proteinen, die zur Antigenpräsentation benötigt werden, z.B. Bestandteile der MHC-Komplexe I und II (*Major Histocompatibility complex*). Hierdurch erfolgt eine Anbindung der adaptiven an die angeborene Immunantwort.

Unter den Interferon-induzierten Proteinen befinden sich zahlreiche Komponenten der zellulären ND10 *domains*, wie PML, Sp100 und Daxx [Guldner et al., 1992; Bloch et al., 1999], worauf in Abschnitt 1.6.1 näher eingegangen wird.

1.4.2 Blockierung der Interferon-Antwort durch Cytomegaloviren

Cytomegaloviren haben im Laufe ihrer Ko-Evolution mit ihren Wirten Mechanismen entwickelt, die Interferon-Antwort infizierter Zellen zu umgehen, und trotz der Anwesenheit von Interferonen effizient zu replizieren. Durch eine große Anzahl an viralen Genen, die die Immunantwort des Wirts behindern, gelingt es Cytomegaloviren zu replizieren, Viruspartikel zu produzieren und diese weiterzugeben.

Bereits vier bis acht Stunden nach einer CMV-Infektion kommt es zur Produktion von Interferonen [Zhu et al., 1997; Boyle et al., 1999]. Die Aktivierung des IFN-Systems ist dabei unabhängig von der *de novo*-Synthese viraler Proteine, da Virion-assoziierte Proteine als fremde Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) von den betroffenen Zellen erkannt werden [Netterwald et al., 2004].

Aufgrund spezifischer viraler Mechanismen, die der IFN-Antwort entgegenwirken, kommt es jedoch nach Beginn der viralen Gentranskription zu einem Einbruch in der IFN-Produktion [Browne et al., 2001]. Ein HCMV-Protein, das die Aktivierung der IFN-Produktion zu sehr frühen Zeitpunkten der Infektion blockiert, ist das Tegumentprotein pp65. Es wird vermutet, dass die Synthese von $IFN\beta$ durch eine Blockade des IFN-

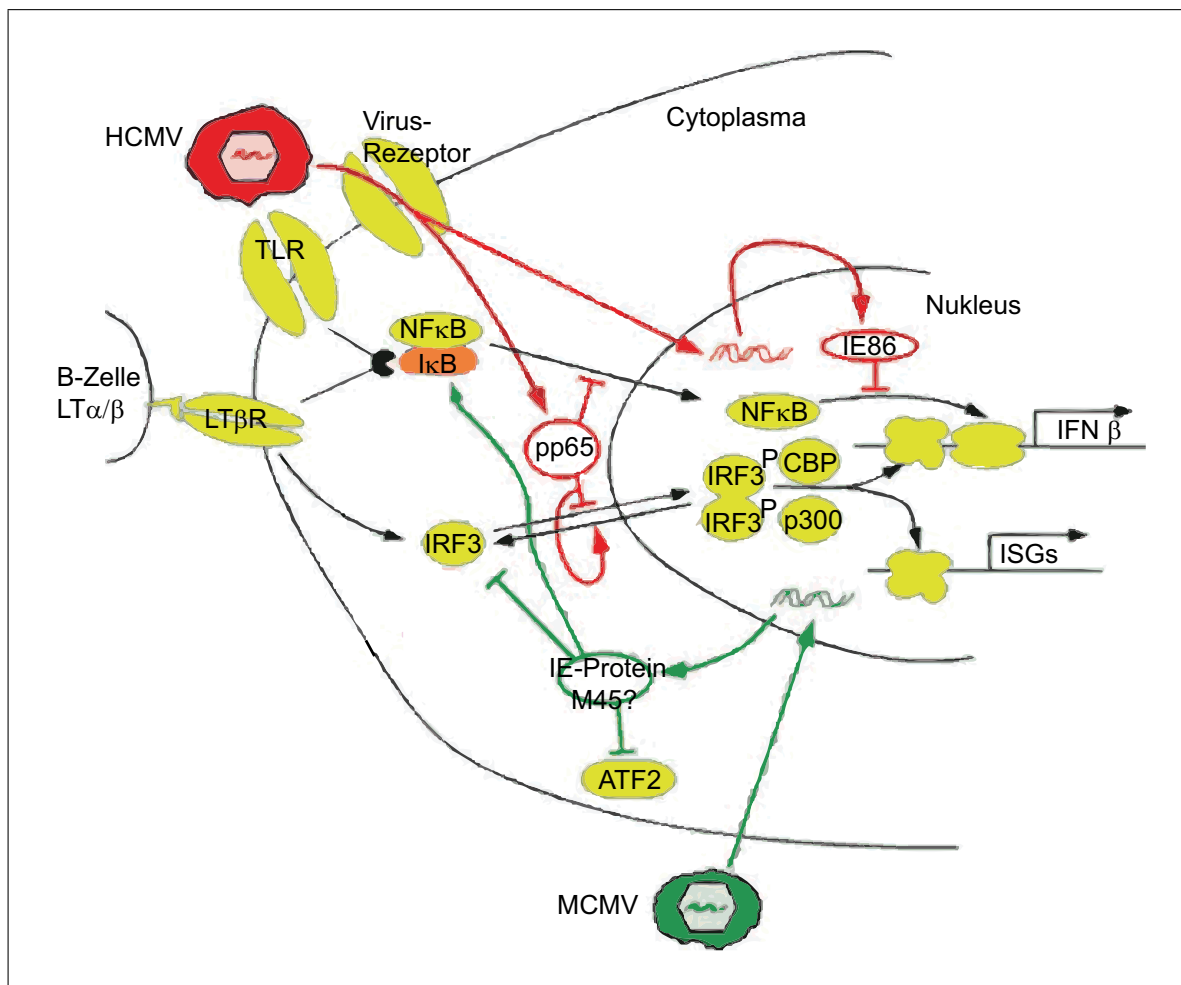


Abbildung 1.8 Umgehung der frühen IFN-Antwort durch Cytomegaloviren. Eine CVM-Infektion aktiviert Signalwege, die zur Induktion von IFNs und ISGs führen (gelbe Symbole). HCMV (rot) und MCMV (grün) besitzen Virionen-Bestandteile und kodieren für IE-Proteine, die diese Abwehrmechanismen umgehen. Modifiziert nach Marshall and Geballe [2009].

regulierenden Faktors 3 (IRF3) vermindert wird (Abb. 1.8) [Browne and Shenk, 2003; Abate et al., 2004]. Die Blockade der IFN-Antwort durch pp65 scheint aber noch nicht ausreichend zu sein. Erst nach Beginn der Transkription viraler *immediate early*-Gene kommt es zu einer effektiven Blockade der IFN-Produktion. Hierbei spielt das HCMV-Protein IE86 eine Rolle (Abb. 1.8), welches die NF-κB-induzierte Genexpression verhindert [Taylor and Bresnahan, 2006].

Auch in MCMV-infizierten Zellen wird die IFN-Antwort nach Beginn der viralen Genexpression unterdrückt. Zwar wird die IFN-Expression zu Beginn der Infektion induziert, sechs Stunden nach Infektion lässt diese aber bereits wieder nach [Le et al., 2008]. Auch hier wird vermutet, dass IE- oder E-Genprodukte in die Produktion der Interferone eingreifen. So ist bekannt, dass das zu frühen Zeitpunkten der MCMV-Infektion exprimierte

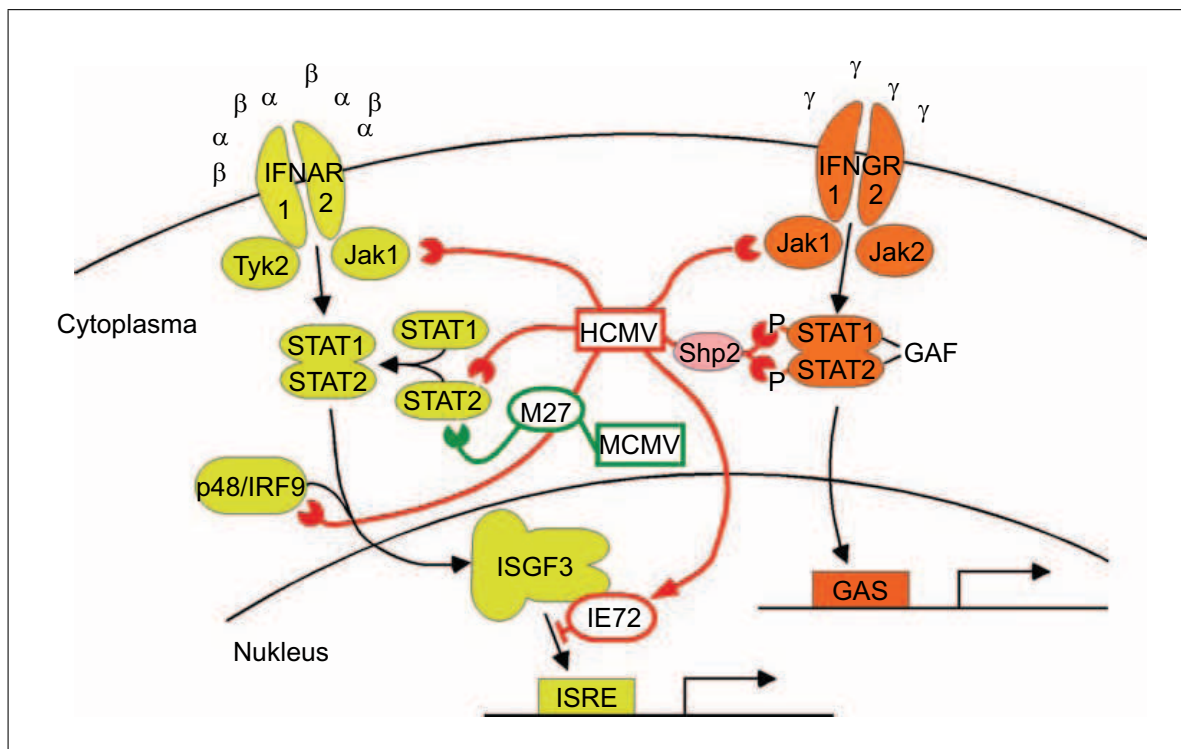


Abbildung 1.9 CMV-induzierte Blockade der Interferon-Signalvermittlung. Die Bindung von Liganden an ihre TypI-IFN(α , β)- und TypII-IFN(γ)-Rezeptoren löst eine Signalkaskade aus, welche die Transkription IFN-stimulierter Gene (ISGs) aktiviert. HCMV (rot) und MCMV (grün) inhibieren diese Signalwege an verschiedenen Stellen. Modifiziert nach Marshall and Geballe [2009].

M45-Protein die NF- κ B-Aktivierung blockiert (Abb. 1.8). Allerdings ist derzeit noch ungeklärt, ob hierdurch die IFN- oder ISG-Produktion beeinflusst wird [Mack et al., 2008].

Neben der Blockade der IFN-Produktion greifen CMV-kodierte Proteine auch in die durch Interferone aktivierten Signalwege der Zelle ein. Der Abbau von Jak1 in HCMV-infizierten Zellen verhindert die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 und damit auch die Expression von ISGs (Abb. 1.9). Es wird vermutet, dass der Eingriff in den Jak/STAT-Signalweg durch HCMV auch zu der verminderten Expression von MHC-II-Molekülen beiträgt, die während der HCMV-Infektion in Endothelzellen und Fibroblasten beobachtet wurde [Scholz et al., 1992; Sedmak et al., 1994].

Das virale IE72-Protein greift in die STAT2-Signalvermittlung ein, indem es die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ISRE-Elemente in zellulären Promotoren blockiert (Abb. 1.9). Hierdurch wird die Expression IFN α / β -stimulierter Gene verhindert [Paulus et al., 2006].

Bei einer MCMV-Infektion wird die STAT2-Expression durch das virale M27-Protein vermindert (Abb. 1.9). Eine Deletion des M27-Gens führt *in vitro* zu einer deutlich ver-

ringerten Virusreplikation in Anwesenheit von TypI- und TypII-Interferonen. Folglich scheint das M27-Protein für die Resistenz von MCMV gegen beide Interferone von großer Bedeutung zu sein [Zimmermann et al., 2005]. *In vivo* ist das M27-Protein für die Replikation von MCMV sogar essentiell, was unter Umständen auf die Blockade der TypI- und TypII-IFN-Systeme durch M27-Proteine zurückzuführen ist, durch welche die Synergie zwischen den beiden Systemen gestört wird [Zimmermann et al., 2005].

Neben den oben genannten Mechanismen der CMV-induzierten Inhibierung der IFN-Antwort umgehen Cytomegaloviren auch die Funktionen der IFN-induzierten antiviralen Proteine. Die Proteinkinase R, die doppelsträngige RNA im Cytoplasma detektiert und daraufhin die virale Proteinsynthese verhindert, wird durch die HCMV-Proteine IRS1 und TRS1 bzw. durch die MCMV-Proteine m142 und m143 blockiert [Child et al., 2004, 2006].

Darüber hinaus existieren noch weitere Mechanismen, mit denen Cytomegaloviren die antivirale IFN-Antwort umgehen. In vielen Fällen ist jedoch noch nicht geklärt, welche viralen Faktoren die IFN-Produktion, die Signaltransduktion oder die Funktion antiviraler Proteine blockieren bzw. umgehen.

1.5 Protein-Modifikation durch SUMO

1.5.1 Eigenschaften der SUMO-Proteine

Die SUMOylierung von Proteinen ist eine posttranslationale Modifikation, bei der eine der vier Isoformen des SUMO (**s**mall **u**biquitin-related **m**odifier)-Proteins an ein Zielprotein konjugiert wird. SUMO-Proteine besitzen ein Molekulargewicht von ca. 10 kDa und ähneln in ihrer Struktur Ubiquitin [Bayer et al., 1998]. Sie sind in der Lage, reversibel Proteine zu modifizieren und beeinflussen die Lokalisation, Funktion und Stabilität der modifizierten Proteine [Matunis et al., 1996]. Die SUMOylierung und deSUMOylierung von Proteinen sind hochdynamische Prozesse, von denen hauptsächlich nukleäre Proteine betroffen sind.

So wird z.B. durch eine SUMOylierung des CREB-bindenden Proteins CBP die Transkriptionsaktivität des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP-response element binding protein*) vermindert. Ein weiteres Beispiel stellt das Tumorsuppressorprotein p53 dar, welches durch SUMOylierung aktiviert werden kann und so eine Stress-Antwort oder vorzeitige Seneszenz von Zellen induziert. Eine wichtige Rolle spielt die SUMOylierung auch bei der Bildung der nukleären ND10 *domains*, deren Hauptbestandteil, das PML-Protein, erst durch SUMOylierung andere ND10-assoziierte Proteine rekrutieren kann.

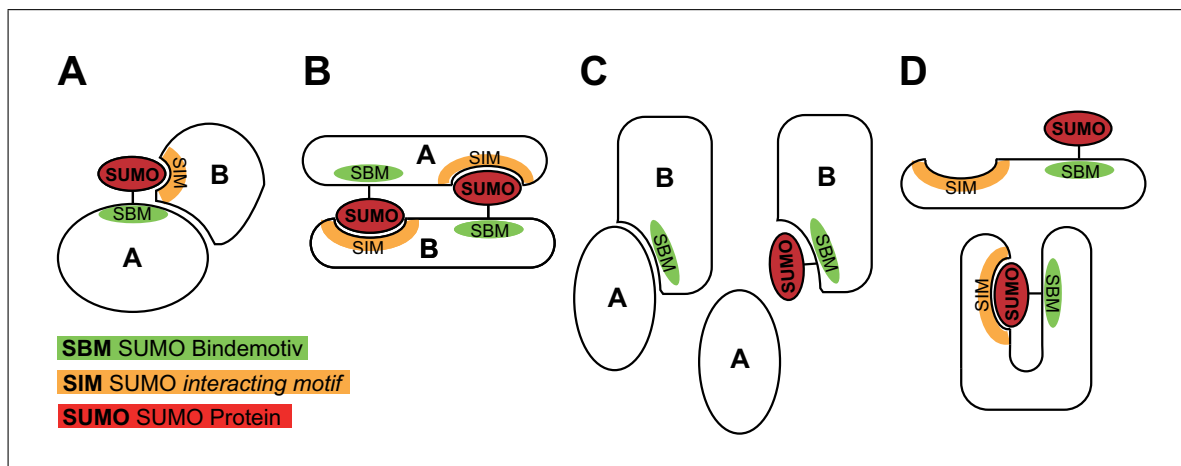


Abbildung 1.10 SUMO-vermittelte Protein-Protein-Interaktionen.

(A) Stabilisierung einer spezifischen Protein-Protein-Interaktion durch SUMO. Die Bindung wird über eine Interaktion des an Protein A kovalent gebundenen SUMO-Proteins mit dem SUMO *interacting motif* (SIM) von Protein B stabilisiert. (B) Interaktion von SUMO und SIM in *trans*. (C) Blockade einer Protein-Interaktionsstelle durch kovalente SUMO-Bindung. (D) Intramolekulare Interaktion zwischen einem kovalent gebundenen SUMO-Protein und einem SIM im gleichen Protein.

Das humane Genom kodiert für vier unterschiedliche SUMO-Proteine, SUMO-1 bis SUMO-4, wobei nur SUMO-1 bis SUMO-3 ubiquitär exprimiert werden [Melchior, 2000; Guo et al., 2004]. Die SUMO-Isoformen vermitteln unterschiedliche Funktionen, indem sie *in vivo* an unterschiedliche Proteine binden [Saitoh and Hinchey, 2000; Vertegaal et al., 2006]. In den meisten Organismen ist die SUMOylierung von Proteinen ein essentieller Prozess [Nacerddine et al., 2005]. So führt das Fehlen von SUMO-1 zur Letalität von Mäuse-Embryonen und eine reduzierte SUMO-1-Expression zu Entwicklungsdefekten in Mäusen und Menschen [Alkuraya et al., 2006].

Die Folgen, die eine SUMOylierung auf die Funktion des Zielproteins haben kann, sind vielfältig. Auf molekularer Ebene wird durch die SUMOylierung die Oberfläche des modifizierten Proteins verändert und hierdurch die Interaktion mit anderen Molekülen beeinflusst. Häufig vermittelt die SUMOylierung Protein-Protein-Interaktionen. SUMO-vermittelte Protein-Protein-Interaktionen beruhen auf dem Zusammenspiel von kovalent SUMOylierten Proteinen mit Proteinen, die sogenannte SUMO *interacting motifs* (SIMs) aufweisen. Der Interaktionspartner eines kovalent SUMOylierten Proteins bindet hierbei nicht-kovalent über Wasserstoffbrückenbindungen an das SUMO-Protein. So interagiert zum Beispiel das RanGTPase-aktivierende Protein RanGAP1 nach SUMOylierung mit dem Ran-bindenden Protein RanBP2 [Matunis et al., 1996].

In Abbildung 1.10 A ist eine SUMO-SIM-vermittelte Protein-Protein-Interaktion dargestellt. Spezifische Protein-Protein-Interaktionen können durch eine solche SUMO-SIM-

Interaktion stabilisiert werden. Die Protein-Protein-Interaktion zwischen zwei gleichen Proteinen kann ebenfalls über eine SUMO-SIM-Interaktion *in trans* vermittelt werden (Abbildung 1.10 B). Dies kann zum Beispiel bei Bildung der ND10 *domains* durch Interaktionen zwischen PML-Proteinen erfolgen [Shen et al., 2006].

Auch eine Inhibierung von Protein-Protein-Interaktionen kann durch eine SUMOylierung ausgelöst werden. So gibt es Beispiele, in denen die SUMO-Bindestelle mit Bindestellen für Protein-Interaktionen überlappt, so dass diese durch eine SUMOylierung des Proteins maskiert werden [Zheng and Yang, 2004; Lin et al., 2003]. Dieser Vorgang ist in Abbildung 1.10 C schematisch dargestellt. Weiterhin kann durch eine SUMOylierung auch die Konformation eines Proteins verändert werden (Abbildung 1.10 D) [Baba et al., 2005]. Insgesamt sind die Konsequenzen einer SUMOylierung vom Zielprotein abhängig und können die Interaktion mit Proteinen, DNA oder anderen Makromolekülen sowohl positiv als auch negativ beeinflussen.

1.5.2 Kovalente und nicht-kovalente SUMOylierung

Ähnlich dem Vorgang der Ubiquitinierung, resultiert die SUMOylierung in der Ausbildung einer Isopeptid-Bindung zwischen dem C-terminalen Glycin-Rest des SUMO-Proteins und eine Gruppe von Aminosäuren um einen Lysin-Rest im Akzeptor-Protein. Wie bei einer Ubiquitinierung wird für die kovalente SUMOylierung eine enzymatische Reaktion ausgeführt, bei der drei Klassen von Enzymen, E1 (*activating enzyme*), E2 (*conjugating enzyme*, UBC9) und E3-Proteine (Ligase), involviert sind [Okuma et al., 1999; Lee et al., 1998; Johnson and Gupta, 2001; Kahyo et al., 2001]. Die SUMOylierung ist ein reversibler Prozess. Für die deSUMOylierung sind Sentrin-spezifische Proteasen (SEN1 bis 2 und SEN5 bis 7) verantwortlich, die sich in ihrer Präferenz, unterschiedliche SUMO-Isoformen zu dekonjugieren, unterscheiden.

Als SUMO-Akzeptor-Motiv wurde eine Abfolge von Aminosäuren beschrieben, in der eine aliphatische Aminosäure von einem Lysin-, einer beliebigen Aminosäure und einem Glutamat-Rest gefolgt wird (ψ KxE) [Mahajan et al., 1998; Kamitani et al., 1998; Sternsdorf et al., 1999; Muller et al., 2000]. Obwohl dieses Konsensusmotiv in vielen SUMO-Akzeptor-Proteinen gefunden wurde, gibt es auch SUMOylierte Proteine, die dieses Motiv nicht aufweisen.

Neben der enzymatischen Modifizierung von Zielproteinen kann auch eine nicht-kovalente Interaktion mit SUMO-Proteinen erfolgen. Für die Bildung SUMO-vermittelter Protein-Protein-Interaktionen ist die nicht-kovalente Modifizierung von Proteinen durch SUMO-Proteine ebenso unverzichtbar wie die kovalente SUMOylierung von Zielproteinen. Diese nicht-kovalente SUMOylierung wird über sogenannte SUMO *interacting motifs* (SIM) ermöglicht [Minty et al., 2000]. Durch den Vergleich aller bisher beschriebenen SUMO

interacting motifs wurde eine SIM-Konsensussequenz ermittelt [Hecker et al., 2006]. Alle SIMs beinhalten eine hydrophobe Kernsequenz, die aus drei oder vier Isoleucin-, Leucin- oder Valin-Resten besteht. An Position zwei oder drei der Konsensussequenz befindet sich eine saure Aminosäure. Die Umgebung dieser hydrophoben Kernsequenz besteht aus mehreren sauren Aminosäuren, woraus eine negative Nettoladung dieser Bereiche resultiert. Die Spezifität, eine bestimmte SUMO-Isoform zu binden, wird durch die Aminosäuresequenz des SIMs bestimmt [Hecker et al., 2006]. Es ist zu vermuten, dass sowohl die Umgebung des SIMs, als auch die Konformation und die subzelluläre Lokalisation die Fähigkeit eines Proteins, mit SUMOylierten Proteinen zu interagieren, beeinflusst.

Unter den Proteinen, die mit den ND10 *domains* im Zellkern assoziiert sind, interagieren viele nicht-kovalent mit SUMO [Hecker et al., 2006; Minty et al., 2000; Takahashi et al., 2005]. Es wird vermutet, dass SIMs eine Rolle bei der Bildung der ND10 *domains* spielen und die Rekrutierung von ND10-assoziierten Proteinen vermitteln.

Auch virale Proteine können die SUMOylierung zellulärer Proteine beeinflussen, oder selbst SUMOyliert werden. Virale Proteine, die in die SUMOylierung zellulärer Proteine eingreifen, können entweder die *de novo*-SUMOylierung zellulärer Proteine verhindern, die deSUMOylierung beschleunigen oder durch eigene SUMOylierung um die vorhandenen SUMO-Vorräte konkurrieren. Es stellte sich heraus, dass virale Proteine hauptsächlich durch das SUMO-1-Protein modifiziert werden [Boggio and Chiocca, 2006]. Die viralen Proteine, die mit SUMO interagieren, sind generell durch DNA-Viren kodiert, die im Zellkern replizieren. Alle bisher bekannten SUMOylierten viralen Proteine sind *immediate-early*- oder *early*-Proteine mit nukleärer Lokalisation [Boggio and Chiocca, 2006]. Ein genauer untersuchtes Protein, dass in seiner Funktion auf die Modifikation durch SUMO angewiesen ist, ist das HCMV-Protein IE1 [Müller and Dejean, 1999]. Auf die SUMO-vermittelten Funktionen von IE1 wird im Abschnitt 1.6.2 eingegangen.

1.6 ND10 *domains* und PML-Proteine in der CMV-Infektion

1.6.1 Zusammensetzung und Funktionen der ND10 *domains*

ND10 *domains*, die auch als PODs (PML *oncogenic domains*) oder PML *nuclear bodies* bezeichnet werden, sind nukleäre Kompartimente mit einem Durchmesser von 0,2 bis 1 μm , die in fast allen Säugetier-Zellkernen vorhanden sind. Typischerweise sind in Zellkernen zwischen 1 bis 30 dieser Kompartimente vorhanden, wobei die Anzahl der ND10 *domains* u. a. vom Zelltyp, der Phase des Zellzyklus und vom Differenzierungsgrad der Zelle abhängt [Dellaire and Bazett-Jones, 2004].

Als Rückgrat der ND10 *domains* wird das PML (*promyelocytic leukemia*)-Protein bezeichnet, welches für die Bildung der ND10 *domains* essentiell ist [Ishov et al., 1999]. Durch alternatives Splicing werden sieben Isoformen des PML-Proteins gebildet, von denen sechs nukleär (PML I bis VI) und eine cytoplasmatisch (PML VII) lokalisiert sind [Jensen et al., 2001]. Im konservierten N-Terminus der PML-Proteine befindet sich eine RING-Domäne [Ishov et al., 1999]. RING-Domänen sind Cystein-reiche Motive, die zwei Zink-Atome binden können [Lovering et al., 1993]. Diese Domänen ermöglichen die Bildung größerer Protein-Aggregate und sind für viele zelluläre Prozesse notwendig, wie z.B. Zellwachstum, Entwicklung, Onkogenese und Apoptose [Borden, 2000]. Weiterhin spielen RING-Domänen eine Rolle in der Ubiquitinierung von Proteinen [Joazeiro and Weissman, 2000]. Aufgrund ihrer Struktur sind PML-Proteine nicht nur für die Bildung des Gerüsts der ND10 *domains* verantwortlich, sie sorgen auch für die Rekrutierung und die korrekte Lokalisation aller ND10-assoziierten Proteine [Ishov et al., 1999]. PML-Proteine werden, wie auch viele weitere ND10-assoziierte Proteine, posttranslational SUMOyliert (vgl. Abschnitt 1.5) [Sternsdorf et al., 1997]. Die SUMOylierung der PML-Proteine ist für die Bildung der ND10 *domains* essentiell, da durch die SUMOylierung weitere Proteine, wie SP100 und Daxx zur Bildung der ND10 *domains* rekrutiert werden [Ishov et al., 1999]. Interaktionen der SUMOylierten Proteine werden in den ND10 *domains* sowohl durch die kovalente SUMOylierung als auch über SUMO interacting motifs (SIMs) vermittelt [Shen et al., 2006]. Da ND10 *domains* heterogene Strukturen sind, die dynamisch auf Veränderungen in der Zelle reagieren, variiert die Zusammensetzung der ND10 *domains*. Viele Proteine lokalisieren transient in den ND10 *domains* [Negorev and Maul, 2001]. Eine Auswahl an Proteinen, die im Zusammenhang mit ND10 *domains* beschrieben wurden, ist in Tabelle 1.1 aufgeführt. Für ND10 *domains* sind Funktionen in unterschiedlichen Zusammenhängen beschrieben worden. Aufgrund der Nähe von ND10 *domains* zu stark acetylierten Chromatin-Regionen, der großen Anzahl an Transkriptionsfaktoren, die in ND10 *domains* gefunden wurden, sowie der Präsenz von entstehender RNA in unmittelbarer Nähe zu ND10 *domains*, wird vermutet, dass sie eine Rolle bei der Regulation der Transkription spielen [Zhong et al., 2000a]. Der molekulare Mechanismus der ND10-vermittelten Regulation der Transkription ist jedoch bisher nicht geklärt. Ebenfalls wird eine Funktion als Antwort auf Beschädigungen der DNA vermutet. So erhöht sich die Anzahl und Größe der ND10 *domains* aufgrund von genotoxischem Stress. Auch wurde eine Kolo-kalisation von ND10 *domains* mit Orten der DNA-Reparatur und mit einzelsträngiger DNA beobachtet. Zudem lokalisieren zahlreiche DNA-Reparatur-Proteine dynamisch in ND10 *domains* [Dellaire and Bazett-Jones, 2004]. Weiterhin stellen PML-Proteine wichtige Faktoren in der Regulation der Apoptose dar. So rekrutieren PML-Proteine p53-Proteine in die ND10 *domains*, wo diese durch Acetylierung

Tabelle 1.1 Beispiele für ND10 *domain*-assoziierte Proteine

Protein	Funktion	ND10-Assoziation
PML	Essentiell für ND10-Bildung, rekrutiert weitere Proteine	Konstitutiv
Sp100	Interaktion mit HP1 (Heterochromatin Protein)	Konstitutiv
Daxx	Transkriptioneller Korepressor, bindet an acetylierte Histone	Konstitutiv
SUMO	Modifiziert PML, SP100 u. a. Proteine	Konstitutiv
SEN-1	deSUMOyliert PML u. a. Proteine	Transient
HP1	Interaktion mit Sp100, ND10-Assoziation ist abhängig vom Zell-Zyklus	Transient
CBP	Interaktion mit PML in einigen Zelltypen	Transient
GAPDH	Interaktion mit PML	Transient
p53	wird von PML u. SUMO aufgrund von zellulärem Stress modifiziert	Transient
Casp2	Caspase2, Apoptose-Regulator	Transient
SRF	Interaktion mit PML u. CBP nach Serum-Stimulation	Transient
HDAC2	Histon-Deacetylase, Regulation der Transkription	Transient

und Phosphorylierung aktiviert werden. Auch andere p53-regulierende Proteine akkumulieren in ND10 *domains*. Die ND10 *domains* könnten auf diese Weise die p53-vermittelte Apoptose regulieren [Takahashi et al., 2004]. Darüber hinaus wurden viele weitere Funktionen für ND10 *domains* postuliert, beispielsweise die p53-unabhängige Apoptoseregulation, die Inhibierung der Zellproliferation, die Kontrolle der Genomstabilität und die Regulation der antiviralen Zellantwort.

Als Antwort auf zellulären Stress steigert sich die Anzahl und die Größe der ND10 *domains*. In den meisten Fällen geschieht dies durch eine verstärkte Expression von PML-Proteinen, z.B. infolge der Wirkung von TypI- und II-Interferonen. Auch die Transkription weiterer ND10-assoziiierter Proteine, wie Sp100 und Sp110, wird durch Interferone verstärkt [Guldner et al., 1992; Bloch et al., 1999]. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, dass die Struktur der ND10 *domains* aus einer ringförmigen Proteinschicht besteht, die um eine Schicht aus Nukleinsäuren und einen Protein-Kern herum angelagert ist [Boisvert et al., 2000]. An der Peripherie der ringförmigen Schicht stehen die ND10 *domains* in engem Kontakt mit Chromatin. In Fällen, in denen die Chromatin-Kondensation

gestört ist, wie z.B. bei Stress oder Apoptose, geht der Kontakt der ND10 *domains* zum Chromatin verloren und es erfolgt eine Destabilisierung der ND10 *domains* [Eskiw et al., 2004].

Obwohl die Lokalisation und die Anzahl der ND10 *domains* hochvariabel ist, zeigen ND10 *domains* an sich keine wesentliche Motilität im Zellkern [Muratani et al., 2002]. Allerdings wurde die Bildung kleinerer ND10-Aggregate beobachtet, die eine höhere Motilität aufweisen [Eskiw et al., 2003]. Es wird vermutet, dass diese kleineren Aggregate eine Sensor-Funktion ausüben, die im Zellkern Beschädigungen der DNA, zellfremde DNA oder Proteine detektieren. An diesen kleineren Aggregaten kann es durch Anlagerung weiterer Proteine zur Bildung von neuen ND10 *domains* kommen. Auch eine *de novo*-Bildung von ND10 *domains* aus im Nukleoplasma vorhandenen Proteinen wird als Möglichkeit betrachtet, die hohe Dynamik der ND10 *domains* zu erklären.

Aus den bisher bekannten Fakten über ND10 *domains* kann zusammenfassend geschlossen werden, dass diese Kompartimente eine dynamische Struktur besitzen, die vielfältige Aufgaben bei der zellulären Stressantwort übernehmen. Aufgrund der hohen Komplexität dieser Strukturen ist es jedoch schwierig, die genauen Mechanismen der regulatorischen Funktionen von ND10 *domains* aufzuklären.

1.6.2 ND10 *domains* in der viralen Infektion

ND10 *domains* sind auch während der viralen Infektion von Bedeutung. Nach einer Infektion mit Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) wurden virale Genome, sowie Replikations-Komplexe in großer Nähe zu ND10 *domains* beobachtet [Maul et al., 1996]. Dies konnte auch für alle anderen Herpesviren sowie für Polyomaviren nachgewiesen werden. Nachdem das virale Genom durch die Kernporen in den Nukleus gelangt ist, kommt es vermutlich zu einer *de novo*-Formation von ND10 *domains* an den viralen Genom-Protein-Komplexen. Die ND10 *domains* verlagern sich dabei an die Seite des Zellkerns, an der virale Genome eindringen [Everett and Murray, 2005]. Die Assoziation zwischen ND10 *domains* und viralen Genomen kann daher als eine Antwort der Zelle auf die virale Infektion betrachtet werden.

Dieser Vorgang ist auch in MCMV-infizierten Zellen zu beobachten. Es wird vermutet, dass die Akkumulation der ND10 *domains* an viralen Genomen durch die Präsenz „fremder“ DNA-Protein-Komplexe induziert wird [Tsukamoto et al., 2000]. Andererseits akkumulieren ND10 *domains* auch an Orten hoher transkriptioneller Aktivität, wodurch die Lokalisation an viralen Genomen erklärbar wäre [Wang et al., 2004]. Die Bildung der ND10 *domains* in der Nähe von viralen Genomen ist überraschenderweise nicht von der Anwesenheit von PML-Proteinen abhängig. In Zellen, in denen die Bildung von PML-Proteinen durch shRNA-Expression inhibiert wird, kommt es trotzdem zu einer Ansammlung ande-

rer ND10-assoziiierter Proteine, wie SP100 und Daxx [Everett et al., 2006]. Die Rolle der ND10 *domains* in der viralen Infektion wird kontrovers diskutiert. Eine geläufige Interpretation ist, dass ND10 *domains* Bestandteil der intrinsischen Abwehr gegen die virale Infektion sind. Es wurde gezeigt, dass eine Überexpression von PML-Proteinen die Replikation verschiedenener RNA-Viren, Adenoviren und HCMV inhibiert [Chelbi-Alix et al., 1998]. Weiterhin konnte in Abwesenheit von PML-Proteinen eine erhöhte Replikation von HCMV beobachtet werden [Ahn and Hayward, 2000; Tavalai et al., 2006].

Andererseits wurde auch gezeigt, dass die Replikation viraler Genome in Assoziation mit ND10 *domains* stattfindet. HCMV-Genome assoziieren mit ND10 *domains*. Dabei kolo-kalisieren die neu synthetisierten viralen *immediate early*-Proteine IE1 und IE2 mit ND10 *domains* und den dort assoziierten viralen Genomen [Ishov et al., 1997]. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass ND10 *domains* auch für die Initiation der Virusreplikation eine wesentliche Rolle spielen.

Viele nukleär replizierende Viren besitzen jedoch die Fähigkeit, eine Zerstörung der ND10 *domains* zu frühen Zeitpunkten zu verursachen. So wurde eine Auflösung von ND10 *domains* durch Adenoviren, das Herpes Simplex Virus-1 und das Epstein-Barr Virus (EBV) beobachtet. Im Falle einer HCMV-Infektion wird eine Auflösung der ND10 *domains* durch das IE1-Protein (pp72) verursacht. Es wurde gezeigt, dass sich IE1-Proteine ausschließlich in den Zellkernen infizierter Zellen befinden und transaktivierend auf virale und zelluläre Promotoren wirken [Stenberg and Stinski, 1985; Margolis et al., 1995]. HCMV IE1-Proteine lokalisieren zu frühen Zeitpunkten an ND10 *domains* und interagieren direkt mit ND10 *domain*-Proteinen, z.B. mit der Histondeacetylase 3 (HDAC3) [Nevels et al., 2004]. HCMV IE1-Proteine können, wie andere zelluläre ND10-assoziierte Proteine, beispielsweise PML-Proteine, durch SUMO modifiziert werden [Spengler et al., 2002]. Durch die Anwesenheit von IE1-Proteinen wird die Menge SUMOylierter PML-Proteine reduziert [Lee et al., 2004], was in einer Auflösung der ND10 *domains* resultiert. Transaktivierende Funktionen sind auch für das MCMV-Homolog des IE1-Proteins beschrieben worden [Messerle et al., 1992]. Auch bei einer MCMV-Infektion werden die zellulären ND10 *domains* zu frühen Zeitpunkten zerstört. MCMV IE1-Proteine lokalisieren an ND10 *domains* und interagieren dort mit HDAC2-, Daxx- und PML-Proteinen [Tang and Maul, 2003]. Aufgrund der Kolo-kalisation von IE1-Proteinen mit ND10 *domains*, der Interaktion mit ND10-assoziierten Proteinen sowie der frühen und starken Expression von IE1-Proteinen ist zu vermuten, dass ein ähnlicher Mechanismus wie bei einer HCMV-Infektion zur Auflösung der ND10 *domains* führt. Es wurde aber bisher nicht beschrieben, ob MCMV IE1-Proteine SUMOyliert werden und ob eine SUMO-abhängige Auflösung der ND10 *domains* erfolgt.

Es ist nicht vollständig geklärt worden, warum CMV und andere Viren eine Auflösung der ND10 *domains* herbeiführen. Auf der einen Seite ist für das PML-Protein eine Funktion als transkriptioneller Repressor beschrieben worden [Zhong et al., 2000b]. Um eine Repression der Transkription durch PML-Proteine zu verhindern und so die Transkription viraler Gene zu ermöglichen, könnte eine Auflösung der ND10 *domains* und deSUMOylierung der PML-Proteine für die virale Transkription von Nutzen sein. Weiterhin könnten durch die Auflösung der ND10 *domains* Transkriptionsfaktoren, die dort gebunden sind, freigesetzt und für die virale Transkription genutzt werden. Auf der anderen Seite akkumulieren in den ND10 *domains* viele Interferon-induzierbare Proteine, die an der zellulären Abwehr gegen die virale Infektion beteiligt sind. Die Zerstörung der ND10 *domains* könnte ein Mechanismus des Virus sein, die Interferon-induzierten antiviralen Vorgänge in der Zelle zu unterdrücken.

Zusammengefasst stellt die Interaktion viraler Proteine und Genome mit zellulären ND10 *domains* einen hochkomplexen Vorgang dar. Von der zellulären Seite her werden virale Genome im Zellkern erkannt, die virale Transkription reprimiert und die Interferon-induzierte Abwehr gegen die virale Infektion aktiviert. Von der viralen Seite her betrachtet, scheinen ND10-assoziierte Transkriptionsfaktoren für die Replikation benötigt zu werden. Dennoch werden die ND10 *domains* durch virale Proteine zerstört.

1.7 Ziel der Arbeit

Ein Charakteristikum der Cytomegalovirus-Infektion ist das Auftreten eines cytopathischen Effekts, der mit der Abrundung infizierter Zellen und Veränderungen im Cytoskelett einhergeht. In HCMV-infizierten Zellen wird dieser Effekt vornehmlich durch die Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum ausgelöst. Als viraler Faktor, der die Freisetzung der Calcium-Ionen induziert, wurde das Protein pUL37x1 identifiziert [Sharon-Friling et al., 2006; Poncet et al., 2006].

Für die Induktion des cytopathischen Effekts in MCMV-infizierten Zellen sind Genprodukte des M25 ORFs verantwortlich [Sengstake, 2009]. Durch den M25 ORF werden mehrere Proteine unterschiedlicher molekularer Masse zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion synthetisiert. Für das 130 kDa-Protein M25-ATG2 wird vermutet, dass es ein Bestandteil des viralen Teguments ist [Wu et al., 1999; Kattenhorn et al., 2004]. Es wird in größerer Menge zu späten Zeitpunkten der Infektion exprimiert. Das 105 kDa-Protein M25-ATG6 wird zu frühen Zeitpunkten der MCMV-Infektion exprimiert. Weder ist bekannt, welches der M25-Proteine den cytopathischen Effekt auslöst, noch ist der Mechanismus der MCMV-induzierten Zellabrundung bisher untersucht worden.

Das Ziel dieser Arbeit war daher, die Eigenschaften und Funktionen der einzelnen M25-Proteine näher zu charakterisieren. Hierfür sollte ein GFP-exprimierendes MCMV-Virus

hergestellt werden, dessen M25-Sequenz mit einer Epitop-Markierung versehen werden sollte. Hiermit sollte die subzelluläre Lokalisation der M25-Proteine im Verlauf der Infektion beobachtet werden.

Um zu untersuchen, ob die verschiedenen M25-Proteine unterschiedliche Funktionen ausüben, sollten retrovirale Expressionsvektoren hergestellt werden, welche die beiden Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 einzeln exprimieren. Mit diesen retroviralen Vektoren sollte überprüft werden, ob M25-Proteine auch unabhängig von einer MCMV-Infektion Veränderungen in der Morphologie transduzierter Zellen auslösen können. Auch die Frage, welches der M25-Proteine für die Induktion des cytopathischen Effekts verantwortlich ist, sollte hierbei beantwortet werden.

Durch die Analyse der M25-Aminosäuresequenz sollten Hinweise darauf gewonnen werden, ob M25-Proteine Signal-Sequenzen für die subzelluläre Lokalisation aufweisen oder ob sie ggf. posttranslational modifiziert werden. Die subzelluläre Lokalisation der Proteine könnte weitere Hinweise auf mögliche Funktionsweisen der M25-Proteine geben. Aus diesem Grund sollte gezeigt werden, in welchen zellulären Kompartimenten sich die Proteine befinden.

Durch Vergleiche der Replikationseigenschaften des MCMV-Wildtyp-Virus mit einer M25-Deletionsmutante sollte die Relevanz der M25-Proteine für die virale Replikation und Proteinsynthese untersucht werden. Auch der Einfluss der M25-Proteine auf Komponenten des zellulären Aktin-Cytoskeletts sollte durch Vergleiche der beiden Virusvarianten analysiert werden.

KAPITEL 2

MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien und Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma Aldrich, Steinheim, Roth, Karlsruhe und Merck, Darmstadt bezogen. Die verwendeten Plastikwaren wurden von Greiner Bio-One, Frickenhausen, Falcon, Heidelberg, Eppendorf, Hamburg, und Sarstedt AG & Co, Nümbrecht bezogen.

2.1.2 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.1 Verwendete Laborgeräte und Materialien

Avanti J-25 Zentrifuge	BeckmanCoulter, Fullerton, USA
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
CO ₂ Zellkultur-Inkubator	Sanyo, Wood Dale, IL, USA
Deckgläschen (Ø 12 mm)	Menzel GmbH, Braunschweig
Durchflussscytometer Cytomics FC500	BeckmannCoulter, Fullerton, USA
Elektroporations-Küvetten	PeqLab, Erlangen
Gel-Dokumentation	Alpha Innotech Corp., San Leandro, GB
Gene Pulser Xcell System	Biorad, München
Heraeus Megafuge 1.0	ThermoScientific, Waltham, USA
Heraeus Multifuge 3SR+	ThermoScientific, Waltham, USA
JA-10-, JA-20.1-, Type-19-, SW40-Rotoren	BeckmanCoulter, Fullerton, USA
LAS-3000 Imager	FujiFilm, Düsseldorf
Leica TCS SP5 MP Mikroskop	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Microlance 3, Kanülen 0,3 x 13 mm	BD Biosciences, Heidelberg

Mini-Protean Electrophoresis System	Biorad, München
Mini Trans-Blot Cell	Biorad, München
Nikon Eclipse T5100	Nikon GmbH, Düsseldorf
Nitrocellulose-Membran	Hybond-ECL, Amersham Biosciences
Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig
PerfectBlue™ Mini/Maxi S gel system	PeqLab, Erlangen
Schüttel-Inkubator Innova 4400	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Sterilwerkbank Heraeus HeraSafe	Kendro, Rodenbach
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
TE 62 Transfer Unit	Amersham Biosciences, Freiburg
Ultrazentrifuge Optima L-70	BeckmanCoulter, Fullerton, USA
UV/Vis Spektralphotometer Nanodrop	Peqlab, Erlangen
Zeiss Axio Observer Mikroskop	Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Zeiss Axiovert 40C	Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Zeiss Axiovert 40CFL	Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Zentrifugen 5415D, 5415R	Eppendorf, Hamburg

2.1.3 Zellen und Bakterienstämme

NIH 3T3: Murine Fibroblasten, bezogen von ATCC, CRL-1658

MEF: Primäre murine embryonale Fibroblasten, päpariert aus zwei Wochen alten BALB/c Maus-Embryonen

Phoenix gp: 293T-Zellen, die das MLV gag/pol-Protein exprimieren.

***E. coli* DH10B:** F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ -, bezogen von Invitrogen

***E. coli* PIR1:** F- Δ lac169 rpoS(am) robA1 creC510 hsdR514 endA recA1 uidA (Δ Mlu I)::pir-116, exprimieren das Bakteriophagen-Protein λ pi, bezogen von Invitrogen

2.1.4 Antikörper und Antibiotika

Tabelle 2.2 Antikörper für Immunfluoreszenz und Immunoblots

Name	Spezies	Quelle
MCMV IE1 (CROMA101)	Maus, monoklonal	S. Jonjic, Rijeka, Kroatien
MCMV E1 (CROMA103)	Maus, monoklonal	S. Jonjic, Rijeka, Kroatien
MCMV 20/352/4 (late Protein)	Maus, monoklonal	B. Bühler, Ulm
Paxillin	Maus, monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg
Influenza-Virus Hämagglutinin-Epitop (HA)	Kaninchen, polyklonal	Sigma Aldrich, Steinheim
PML, clone 36.1-104	Maus, monoklonal	Millipore GmbH, Schwalbach (ehem. Chemicon)
GAPDH, clone 14C10	Kaninchen, monoklonal	Cell Signalling Technologies, Danvers, USA
Maus, Peroxidase-gekoppelt	Schaf-anti-Maus IgG	Amersham, Freiburg
Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt	Ziege-anti-Kaninchen IgG	DAKO, Glostrup, Dänemark
Kaninchen, Alexa 568-gekoppelt	Ziege-anti-Kaninchen IgG	Invitrogen, Heidelberg
Maus, Cy5-gekoppelt	Ziege-anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

Antibiotika

Chloramphenicol (Cam): 170 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (high copy Plasmide), 17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (low copy Plasmide)

Kanamycin (Kan): 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (high copy Plasmide), 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (low copy Plasmide)

Ampicillin (Amp): 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (high copy Plasmide), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (low copy Plasmide)

2.1.5 Plasmide und BACs

pSM3fr: low copy; BAC-Plasmid; enthält die vollständige Sequenz des MCMV-Stamms *Smith*. Cam^R, [Wagner et al., 1999]

pSM3fr-GFP: low copy; BAC-Plasmid; enthält die vollständige Sequenz des MCMV-Stamms *Smith*. Das für das *enhanced green fluorescent protein* (GFP) kodierende Gen wurde in den IE2-Locus des viralen Genoms integriert. Cam^R; [Mathys et al., 2003].

MCMV-GFP $\Delta\text{M24-m25.2}$: low copy; BAC-Plasmid; die M24 bis m25.2 ORFs wurden

durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt. Nach Entfernen der Resistenzkassette verblieb eine FRT-site im BAC. Cam^R; [Sengstake, 2009].

MCMV-GFP ΔM25: low copy; BAC-Plasmid; der M25 ORF wurde durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt. Nach Entfernen der Resistenzkassette verblieb eine FRT-site im BAC. Cam^R; [Sengstake, 2009].

MCMV M25HA: low copy; BAC-Plasmid; an das 3'-Ende des M25 ORFs wurde die Sequenz für ein Hämagglutinin (HA)-Epitop zusammen mit einer Kanamycin-Resistenzkassette angefügt. Nach Entfernen der Resistenzkassette verblieb eine FRT-site außerhalb der M25-Sequenz. Cam^R; [Sengstake, 2009].

pIRES AcGFP M25CHA: high copy; enthält eine „*internal ribosome entry site*“ (IRES) zwischen der „*multiple cloning site*“ und dem AcGFP-Gen. Der vollständige M25 ORF mit C-terminaler HA-Markierung wurde über EcoRI- und PstI-Schnittstellen zwischen dem HCMV *major immediate early promoter* (HMIEP) und der IRES eingefügt. Kn^R; [Sengstake, 2009].

pOri M25: enthält eine *multiple cloning site* und eine Kanamycin-Resistenzkassette mit benachbarter FRT-site. Repliziert nur in Anwesenheit des λ pi-Proteins. Der vollständige M25 ORF mit zusätzlichen Sequenzen stromaufwärts des ersten M25-Startcodons und stromabwärts des M25-Stopcodons wurde über HpaI- und PstI-Schnittstellen eingefügt. Kn^R; [Sengstake, 2009].

pST76-A-Flp: low copy; exprimiert die Flp Rekombinase. Temperatursensitive Replikation bei 30°C. Amp^R. Zur Verfügung gestellt von E. Borst, MHH, Hannover; modifiziert nach Cherepanov and Wackernagel [1995].

pSF β91-eGFP-wpre: Retrovirales Expressionsplasmid, enthält die 3'LTR-Sequenz aus *Spleen Focus-forming Virus* (SFFV), die Leader-Sequenz aus *Murine Embryonic stem cell Virus* (MESV) und das post-transkriptionelle Regulatorische Element (WPRE) aus Murmeltier Hepatitis-Virus. Enthält eine „*internal ribosome entry site*“ (IRES) zwischen der „*multiple cloning site*“ und dem eGFP-Gen. Zur Verfügung gestellt von Johann Meyer, MHH, Hannover; [Hildinger et al., 1999].

K73 pEF1-EcoEnv-IRES(EMCV)-puro: Retrovirus-Herstellung; exprimiert das ecotrope Hüllprotein aus *Vesicular Stomatitis Virus*. Zur Verfügung gestellt von Johann Meyer, MHH, Hannover; [Hildinger et al., 1999].

M57DAW: Retrovirus-Herstellung; exprimiert das Moloney-MLV (*Murine Leukemia Virus*) gag/pol-Protein. Zur Verfügung gestellt von Johann Meyer, MHH, Hannover; [Schambach et al., 2006].

2.2 Eukaryotische und bakterielle Zellkultur

2.2.1 Kultur eukaryotischer Zellen

BALB/c murine embryonale Fibroblasten (MEF) wurden in DMEM (Sigma Aldrich) kultiviert, dem 10 % fetales Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ ml Streptomycin-Sulfat zugesetzt wurden. NIH 3T3 Fibroblasten wurden in Medien gleicher Zusammensetzung kultiviert, jedoch in Gegenwart von 5 % NCS (*newborn calf serum*). Phoenix-Zellen wurden in DMEM (Biochrom) mit 10 % FCS Gold, 2 mM Glutamin, 20 mM HEPES, 1% Natriumpyruvat-Lösung, 100 U/ ml Penicillin und 100 µg/ ml Streptomycin-Sulfat kultiviert. Die Zellen wurden regelmäßig unter Verwendung des Venor®GeM Mycoplasma Detection Kits (Minerva Biolabs, Berlin) auf Mycoplasma-Kontaminationen getestet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkulturinkubator.

Tabelle 2.3 Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur

DMEM (<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM	Biochrom, Berlin
FCS (Fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin
FCS Gold	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
NCS (<i>newborn calf serum</i>)	Biochrom, Berlin
1x Dulbecco's PBS-Puffer (<i>phosphate buffered saline</i>), ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	CytoGen, Sinn
Trypsin-EDTA (0,25 %/ 0,02 %) in PBS	Biochrom, Berlin
HEPES-Puffer	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Natriumpyruvat-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Penicillin/ Streptomycin-Sulfat/ Glutamin-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

2.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Konfluente Zellen wurden durch Trypsin/ EDTA-Behandlung von einer Zellkulturschale abgelöst und in Kulturmedium resuspendiert. Durch Zentrifugation in sterilen 15 ml-Zentrifugenröhrchen für drei Minuten bei 300 x g wurden die Zellen sedimentiert und anschließend in 2,5 ml Medium ohne Zusätze resuspendiert. Je 800 µl der Zellsuspension

wurden in ein steriles Kryoröhrchen überführt und langsam mit Einfrier-Medium (DMEM mit 40% FCS und 20 % DMSO) versetzt. Die Zellen wurden in einem mit Isopropanol gefüllten Kryo-Behälter auf -80°C heruntergekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Nach Überführung der Zellen in ein steriles 15 ml-Zentrifugenröhrchen wurden 5 ml Kulturmedium tropfenweise zugegeben. Anschließend erfolgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 300 x g. Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in Zellkulturgefäßen ausgesät.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden Zellen mit einer 0,4 %igen Trypan-Blau-Lösung verdünnt und mit Hilfe einer Neubauer-Kammer im Lichtmikroskop ausgezählt. Es wurden vier Großquadrate der Kammer ausgezählt und der Durchschnitt berechnet. Die Zellzahl wurde mit 1×10^4 multipliziert, woraus sich die Anzahl der Zellen pro ml ergab.

2.2.4 Bakterienkultur

Bakterien wurden entweder als Platten- oder Flüssigkulturen angezogen. Als Medium wurde Luria-Bertani (LB)-Medium (Trypton, Hefeextrakt, NaCl) verwendet. Nach Bedarf wurden dem Medium Antibiotika zugesetzt. Für Flüssigkulturen wurden 5 ml LB-Flüssigmedium als Vorkultur mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft. Die Vorkultur wurde, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) über Nacht inkubiert. Mit der Vorkultur wurde entweder eine größere Menge an Flüssigmedium angeimpft und Plasmid-DNA isoliert (siehe Abschnitt 2.3.3) oder Bakterien-Zellen für die Langzeitlagerung bei -80°C in 25% Glycerin (Endkonzentration) eingefroren. Durch Ausstreichen von einzelnen Bakterienkolonien mit einer sterilen Impföse oder mit einem Drigalskispatel wurden Bakterienzellen auf LB-Agarplatten vereinzelt. Die Platten wurden über Nacht, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C inkubiert und kurzfristig bei 4°C gelagert. Die Einzelkolonien wurden zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

500 ml LB-Medium wurden mit 2,5 ml einer Vorkultur beimpft und bei 37°C schüttelnd inkubiert, bis eine optische Dichte (OD_{578nm}) von ca. 0,5 erreicht war. Die Zellen wurden für 15 Minuten auf Eis gekühlt und in vorgekühlte sterile Zentrifugenröhrchen überführt. Es

folgte eine Zentrifugation bei 4°C für 15 Minuten bei 4.000 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment mit 50 ml eiskaltem sterilen bidestillierten Wasser resuspendiert. Der Zentrifugations- und Waschschrift wurde unter gleichen Bedingungen wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellsediment in 10 %igem sterilen Glycerin (in H₂O bidest.) gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 0,5 bis 1 ml 10 %igem Glycerin (in H₂O bidest.) aufgenommen und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Für die Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen in kleinem Umfang wurden 5 ml Bakterienkultur nach obigem Protokoll behandelt.

2.3.2 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Elektroporation

Elektroporations-Küvetten (Elektrodenabstand 2 mm) wurden auf Eis vorgekühlt. 50 µl der elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 0,1 bis 2 ng Plasmid-DNA zugegeben. Die Bakterien mit der DNA wurden in die vorgekühlten Küvetten gegeben und bei 25µF, 200 Ohm und 2,5 kV elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen sofort in 500 µl LB-Medium aufgenommen, für eine Stunde bei 37°C (wenn nicht anders angegeben) geschüttelt und auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C (wenn nicht anders angegeben) inkubiert.

2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Von einer *E. coli*-Vorkultur wurden 1,5 ml für 20 Sekunden abzentrifugiert (4.000 rpm, Eppendorf-Zentrifuge 5415R). Das Sediment wurde in 100 µl Lösung I resuspendiert und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II wurden die Zellen fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die alkalische Lyse durch Zugabe von 200 µl Lösung III und fünfminütiger Inkubation auf Eis gestoppt. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 4°C (13.000 rpm, Eppendorf-Zentrifuge 5415R) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 400 µl Isopropanol zugegeben. Die DNA-Fällung erfolgte durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 13.000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5415R) und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5415R) und 4°C wurde der Überstand verworfen und die DNA getrocknet. Die DNA wurde anschließend in 30 µl TE (TRIS/ EDTA)-Puffer unter Zugabe von RNase A-Lösung (Endkonzentration 20 µg/ µl) gelöst und bei -20°C gelagert.

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, wurde das Nucleobond PC100-Kit (Macherey Nagel, Düren) verwendet und eine Aufreinigung nach Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 2.4 Lösungen für die Präparation von Plasmid-DNA

Lösung I:	Lösung II:	Lösung III:
50 mM Glukose	2,0 M NaOH	3M Kaliumacetat
10 mM EDTA	1 % SDS	
25 mM TRIS pH 8,0	pH 12,5 bis 13,0	
TE-Puffer:	TRIS/HCl pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
RNase A-Stocklösung:	RNase A	10 mg/ ml
	TRIS/HCl pH 7,5	10 mM
	NaCl	15 mM

2.3.4 Präparation von BAC-DNA aus *E. coli*

Die verwendeten Lösungen für die Präparation von BAC-DNA entsprachen denen, die für die Präparation von Plasmid-DNA verwendet wurden (siehe Abschnitt 2.3.3). 10 ml LB-Flüssigmedium wurden mit einer Bakterienkolonie beimpft. Dem Medium wurde Chloramphenicol zur Erhaltung des BACs und ggf. weitere Antibiotika zugesetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C und 200 rpm wurden die Bakterien für 10 Minuten bei 4.000 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus) und 4°C sedimentiert. Die Bakterien wurden in 200 µl Lösung I resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung II wurden die Zellen für fünf Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Nach Zugabe von 300 µl Lösung III und Inkubation auf Eis wurde für fünf Minuten bei 13.000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5415R) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von Isopropanol (0,8 x Vol.) und anschließender Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C für 20 Minuten gefällt. Die DNA wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, bei 42°C getrocknet und in 100 µl TE-Puffer mit RNase A gelöst. Um größere Mengen an BAC-DNA von höherer Reinheit zu erhalten, wurde das Nucleobond PC100-Kit (Macherey Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung erfolgte photometrisch durch Messung der OD bei 260 und 280 nm. Eine OD_{260nm} von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ ml. Der Reinheitsgrad einer DNA-Lösung wurde anhand des Quotienten OD_{260nm}/ OD_{280nm} ermittelt. Für nahezu proteinfreie DNA sollte dieser einen Wert zwischen 1,8 und 2 annehmen.

2.3.6 Restriktion von Plasmid-DNA mit Endonukleasen

Die Restriktion von Plasmid-DNA erfolgte mittels Endonukleasen der Firma NEB (Frankfurt) in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben des Herstellers. Die Inkubationsdauer lag zwischen zwei und vier Stunden bei 37°C. Zum Überprüfen der Restriktion wurde die geschnittene DNA auf ein Agarose-Gel aufgetragen (siehe Abschnitt 2.3.9).

2.3.7 Restriktion von BAC-DNA mit Endonukleasen

Für die Restriktion von BAC-DNA wurden 45 µl von in kleinem Volumen hergestellter DNA oder 15 µl mit dem Nucleobond PC100-Kit (Macherey Nagel, Düren) aufgereinigter DNA mit 5 µl 10-fach konzentriertem Reaktionspuffer versetzt. Je nach verwendeten Enzym wurden fünf bis zehn Einheiten des Enzyms, zugegeben. Der Restriktionsansatz wurde für mindestens zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend auf einem BAC-Agarose-Gel aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.3.9).

2.3.8 Dephosphorylierung und Ligation von DNA

Um eine Religation geschnittener Plasmide zu verhindern, wurden die 5'-Enden geschnittener Vektor-DNA mit Hilfe der *calf intestine* Phosphatase (NEB) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Die Ligation von DNA wurde mittels der T4-DNA Ligase (NEB) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Verhältnis von Vektor zu Insert betrug 1:3. Die Ligations-Reaktion erfolgte entweder über Nacht bei 16°C oder für eine Stunde bei Raumtemperatur.

2.3.9 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung von Plasmid-DNA-Fragmenten wurden 0,8 bis 2 %ige Agarose-Gele verwendet. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen überführt. Die Trennung erfolgte in TAE-Laufpuffer (Tabelle 2.5) bei 80 bis 120 V. Nach der Auftrennung wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung inkubiert und die DNA-Fragmente anschließend mit Hilfe einer UV-Lampe detektiert. Die Größen- und Mengenbestimmung erfolgte durch Vergleiche mit zusätzlich aufgetragenen Größenstandards, wie z.B. der 1kb Plus DNA Leiter (Invitrogen, Karlsruhe). Zur Auftrennung geschnittener BAC-DNA wurde das PerfectBlue™ Maxi S Gelsystem (Peqlab, Erlangen) verwendet. 45 µl des Restriktionsansatzes wurden mit 5 µl 10-fach konzentriertem DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein TBE-Gel geladen. Dem Gel wurde Ethidiumbromid zugesetzt. Die Auftrennung der DNA erfolgte in TBE-Puffer (Tabelle 2.5) bei 80 V für 12 bis 16 Stunden.

Tabelle 2.5 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer:	TRIS-Acetat (pH 8,0)	40 mM
	EDTA	1 mM
TBE-Puffer:	TRIS/ HCl pH 8,3	90 mM
	Borsäure	90 mM
	EDTA	2mM
Agarose-Gel:	Agarose in TAE- oder TBE-Puffer	0,8 bis 2 % (w/v)
DNA-Ladepuffer:	Glycerin	50 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,37 mM
	EDTA pH 8,0	10 mM

2.3.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden PCR-Reaktionen unter Verwendung der Phusion *high-fidelity* DNA-Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte dabei nach Angaben des Herstellers. Abweichend vom Standardprotokoll wurde den Reaktionsansätzen 1% DMSO (Endkonzentration) hinzugefügt, da die zu amplifizierende MCMV-DNA einen hohen GC-Gehalt aufwies. PCR-Reaktionen wurden im T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

2.3.11 Quick Mutagenese PCR

Die Quick Mutagenese PCR beruht auf einem Protokoll zur ortsgerichteten Mutagenese doppelsträngiger DNA [Weiner et al., 1994]. Hierbei wird das zu mutierende Plasmid vollständig durch zwei Primer in entgegengesetzter Orientierung amplifiziert (Abb. 2.1). Durch die Verwendung von Primern, die am 5'-Ende phosphoryliert sind, wird die anschließende Ligation des linearen PCR-Produkts ermöglicht. Im Anschluss an die PCR, in der die gewünschte Mutation mit Hilfe geeigneter Primer in das Plasmid eingefügt wurde, wird durch eine Restriktion mit dem Enzym DpnI sämtliche noch vorhandene DNA des nicht mutierten Ausgangsplasmids geschnitten, während das lineare PCR-Produkt, das keine Methylierung trägt, unversehrt bleibt. Hierdurch kann das Vorkommen von Bakterienkolonien, die das Ausgangsplasmid enthalten, stark reduziert werden. Nach der DpnI-Restriktion wird das lineare Plasmid ligiert. Durch Transformation von geeigneten Bakterienzellen wird das modifizierte Plasmid repliziert, aus den Bakterien isoliert und mittels Restriktionsanalysen und Sequenzierung auf die korrekte Einführung der Mutation hin untersucht.

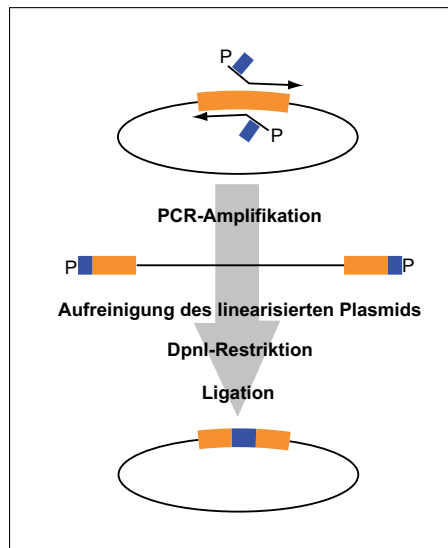


Abbildung 2.1 Mutagenisierung von Plasmiden mit der Quick Mutagenese PCR. Schematische Darstellung der Insertion einer DNA-Sequenz (blau) an einer definierten Stelle eines Plasmid-codierten ORFs (gelb). Die beiden entgegengesetzt orientierten 5'-phosphorylierten Primer amplifizieren das vollständige Plasmid. Über die Primer wird an den 5'- und 3'-Enden des linearen PCR-Produkts die gewünschte Ziel-Sequenz angefügt. Nach Ligation befindet sich die zusätzliche Sequenz im Plasmid.

PCR-Ansatz:	5x Phusion-Polymerase Puffer	10 μ l
	dNTPs (0,2 mM)	2 μ l
	Ausgangsplasmid (5-10 ng/ μ l)	1 μ l
	Primer A (10 μ M)	1 μ l
	Primer B (10 μ M)	1 μ l
	Phusion-Polymerase (2 Units/ μ l)	1 μ l
	H ₂ O bidest.	ad 50 μ l

Die PCR-Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95°C	5 min
Denaturierung	95°C	30 sec
Primer-Bindung	55°C	30 sec
Extension	72°C	1,5 min/ kbp
30 Zyklen		
Finale Extension	72°C	10 min

Das lineare PCR-Produkt wurde mittels Auftragen auf ein Agarose-Gel auf seine korrekte Größe hin überprüft. Bei Vorhandensein eines Fragments der richtigen Größe wurde der gesamte PCR-Ansatz auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen und das lineare Plasmid

aus dem Gel mit Hilfe des UltraClean TM 15-Kits (Mobio, Carlsbad, USA) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die DNA wurde in 20 μ l Wasser eluiert und die methylierte Ausgangs-DNA mit dem Restriktionsenzym DpnI geschnitten. Dies erfolgte in einem Endvolumen von 30 μ l nach Angaben des Enzymherstellers (NEB) für eine Stunde bei 37°C. Nach Inaktivierung des Enzyms durch ein PCR-Aufreinigungs-Kit (Qiagen) erfolgte die Ligation des linearen Plasmids. Hierfür wurden 1 bis 10 μ g des PCR-Produkts eingesetzt.

Ligationsansatz:	10x Ligase-Puffer (NEB)	1 μ l
	Lineares Plasmid	1 bis 10 μ g
	T4 DNA Ligase (NEB) (400 U/ μ l)	1 μ l
	H ₂ O bidest.	ad 10 μ l

Die Ligation erfolgt entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C. Kompetente *E. coli*-Bakterien wurden mit 3 μ l des Ligationsansatzes transformiert (siehe Abschnitt 2.3.2) und auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz ausgestrichen. Aus den resultierenden Bakterien wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe Abschnitt 2.3.3) und durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung überprüft. Die in dieser Arbeit mit einer Quick Mutagenese PCR modifizierten Plasmide sind in Tabelle 2.6 dargestellt. Eine Auflistung der Primer-Sequenzen befindet sich Anhang.

Tabelle 2.6 Mit der Quick Mutagenese PCR modifizierte Plasmide

Ausgangsplasmid	Modifikation	Primer	Zielpiasmid
pOri M25	Anfügen einer C-terminalen HA-Markierung	OriM25HA.for OriM25HA.rev	pOri M25HA
pOri M25HA	Mutation des Kernimport-signals von M25	M25NLSmut.for M25NLSmut.rev	pOri M25HA NLSmut
pSF β 91-eGFP	Einfügen von Restriktions-schnittstellen	pSFbeta91Mfe.for pSFbeta91Age.rev	pSF β 91-eGFP-AgeI-MfeI
pSF M25-ATG6	Mutation des Kernimport-signals von M25	M25NLSmut.for M25NLSmut.rev	pSF ATG6 NLSmut
pSF M25-ATG6	Mutation des SUMO <i>interacting motifs</i> 2	SIM2mut.for SIM2mut.rev	pSF ATG6 SIM2mut
pSF M25-ATG6	Mutation des SUMO <i>interacting motifs</i> 3	SIM3mut.for SIM3mut.rev	pSF ATG6 SIM3mut
pSF M25-ATG6	Mutation des SUMO <i>interacting motifs</i> 4	SIM4mut.for SIM4mut.rev	pSF ATG6 SIM4mut

2.4 Protein-Biochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

MEF oder NIH 3T3-Zellen wurden auf 6-Loch-Zellkulturplatten mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro Ansatz ausgesät. Zur Herstellung von Proteinlysaten MCMV-infizierter Zellen wurden die Zellen mit entsprechenden Virusvarianten mit einer MOI von 1 infiziert und anschließend für 45 Minuten bei $300 \times g$ zentrifugiert, um die Infektions-Effizienz zu steigern. Für die Herstellung von Proteinlysaten retroviral transduzierter Zellen wurden die Zellen mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro Loch ausgesät und mit 10 IU (*infectious units*)/ Zelle der entsprechenden Retroviren transduziert.

Die infizierten und transduzierten Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Trypsinbehandlung geerntet, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und vier Minuten bei $300 \times g$ sedimentiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis, bzw. bei 4°C ausgeführt. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen in 1 ml kaltem PBS-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Bestimmung der Zellzahl (siehe Abschnitt 2.2.3). Die Zellen wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und erneut durch Zentrifugation für vier Minuten bei $300 \times g$ und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die Zell-Pellets entweder bei -20°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von NP40-Lysepuffer (Tabelle 2.7), wobei die Konzentration der Zellzahl durch Zugabe der entsprechenden Menge an Lysepuffer auf 1×10^7 Zellen pro ml eingestellt wurde. Dem Lysepuffer wurde 1 % Proteinase-Inhibitor (Proteinase-Inhibitor-Set III, Calbiochem, San Diego) zugegeben. Die Zellen wurden im Lysepuffer resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis lysiert. Die Proteinlysate wurden mehrfach durch eine Kanüle (Microlance 3, BD Biosciences, Heidelberg) gezogen, um zelluläre DNA zu fragmentieren. DNA und unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 13.200 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5415R) und 4°C für fünf Minuten aus dem Proteinlysat entfernt und die Lysate in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nicht sofort weiterverwendete Proteinlysate wurden bei -80°C gelagert.

Tabelle 2.7 Lösungen für die Herstellung von Proteinlysaten

NP40-Lysepuffer:	TRIS/HCl, pH 7,4	20 mM
	NaCl	140 mM
	NP-40	1 % (v/v)
	MgCl ₂	5 mM
SDS-Probenpuffer:	TRIS/HCl, pH 6,8	100 mM
	SDS	4 % (v/w)
	Bromphenol-Blau	0,2 % (v/w)
	Glycerin	20 % (v/v)

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinlysate wurden mit 2x SDS-Probenpuffer (Tabelle 2.7) und β -Mercaptoethanol (1:35) versetzt und fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte, je nach Größe der zu trennenden Proteine in 10- oder 12 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gelen bei 120 V. Zur Herstellung der Gele wurde eine 40 %ige Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1) verwendet (Qbiogen, Irvine, USA). Die Bestimmung der molekularen Massen wurde durch einen Proteinmarker ermöglicht (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas), der auf jedes Gel mit aufgetragen wurde. Die Angaben in Tabelle 2.8 beziehen sich auf die Herstellung eines SDS-Polyacrylamid-Gels mit einer Breite von 8 cm.

Tabelle 2.8 Lösungen für die SDS-PAGE

Sammelgel (5 %):	40 % Acrylamid-Mix	0,4 ml
	1,5 M Tris/HCl pH 6,8	0,38 ml
	10 % SDS-Lösung	30 μ l
	APS	30 μ l
	TEMED	3 μ l
	H ₂ O	2,2 ml
Trenngel (10 %):	40 % Acrylamid-Mix	1,3 ml
	1,5 M Tris/HCl pH 8,8	1,3 ml
	10 % SDS-Lösung	50 μ l
	APS	50 μ l
	TEMED	2 μ l
	H ₂ O	2,3 ml
Trenngel (12 %):	40 % Acrylamid-Mix	1,5 ml
	1,5 M Tris/HCl pH 8,8	1,3 ml
	10 % SDS-Lösung	50 μ l
	APS	50 μ l
	TEMED	2 μ l
	H ₂ O	2,1 ml
SDS-PAGE-Laufpuffer:	TRIS	25 mM
	Glycin	250 mM
	SDS	0,1 % (w/v)

2.4.3 Proteintransfer

Proteine wurden mit dem Mini Trans-Blot Cell-System aus den Polyacrylamid-Gelen auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Hierzu wurden die Gele direkt nach der Elektro-

phorese, sowie die Nitrocellulose-Membran und Filterpapier für 15 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 0,35 mA für eine Stunde.

Transferpuffer: Methanol 20 % (v/v)
 Tris 40 mM
 Glycin 119 mM

2.4.4 Immunfärbung

Unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran wurden durch eine Inkubation der Membran mit 2 % Magermilchpulver in PBS-Puffer blockiert (4°C, über Nacht). Anschließend wurde die Membran mit dem in PBS/ 0,1 % Tween verdünnten Primärantikörper (siehe Tabelle 2.9) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde drei Mal für 10 Minuten unter leichtem Schütteln mit PBS/ 0,1 % Tween gewaschen und anschließend für eine Stunde mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in PBS/ 0,1 % Tween inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS/ 0,1 % Tween wurde die Membran nach Angaben des Herstellers mit ECL-Lösung (Amersham Biosciences, Freiburg) bedeckt und im LAS-3000 Imager entwickelt.

Tabelle 2.9 Verdünnung der Antikörper für Immunfärbungen

Prim. Antikörper	Verd.	Sek. Antikörper	Verd.
MCMV IE1	1:100	HRP-anti-Maus IgG	1:2000
MCMV E1	1:100		
MCMV 20/352/4	1:100		
Hämagglutinin (HA)	1:1000	HRP-anti-Kaninchen IgG	1:1000
GAPDH	1:1000		

2.5 Mikroskopie

2.5.1 Immunfluoreszenz

MEF wurden am Vortag auf mit Poly-L-Lysin (0,001 %, Sigma Aldrich) beschichteten sterilen Deckgläschen (\varnothing 12 mm) in 24-Loch-Zellkulturplatten mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro Ansatz ausgesät. Zur Detektion von MCMV-Proteinen wurden die MEF mit

einer MOI von 3 infiziert und für drei Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Virus-Inokulum entfernt, nicht gebundene Viruspartikel durch Waschen mit PBS-Puffer entfernt und die Zellen mit frischem Kulturmedium versehen. Zur Detektion von retroviral exprimierten Proteinen wurden die MEF mit den entsprechenden Retroviren transduziert und für 12 Stunden inkubiert. Anschließend wurde frisches Medium zugesetzt und die Zellen für weitere 60 Stunden inkubiert.

Zur Fixierung der Zellen wurde das Kulturmedium entfernt und 300 μ l 3 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS-Puffer auf die Deckgläschen gegeben. Die Zellen wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, das PFA wurde entfernt und die Zellen zwei Mal mit PBS-Puffer gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Inaktivierung des PFA wurden die Deckgläschen 10 Minuten mit Ammoniumchlorid-Lösung (50 mM in PBS) inkubiert. Darauf folgend wurde erneut zwei Mal mit PBS-Puffer gewaschen und die Zellen mit 0,2 % Triton X-100 in PBS für sieben Minuten permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer wurden die Zellen für mindestens 10 Minuten mit 0,2 % Gelatine in PBS-Puffer inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren.

Die Inkubation mit den in 0,2 % Gelatine in PBS-Puffer verdünnten Primärantikörpern (Tabelle 2.10) erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Zellen vier Mal mit 0,2 % Gelatine in PBS-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgte ebenfalls in einer feuchten Kammer. Gegebenfalls wurde gleichzeitig Phalloidin-TRITC (Sigma Aldrich, Steinheim) zur Färbung der Aktinfilamente oder TO-PRO3 (Invitrogen, Heidelberg) zur Färbung der DNA zugesetzt. Nach 45 Minuten wurden die Deckgläschen fünf Mal mit PBS-Puffer gewaschen, mit deionisiertem Wasser gespült und mit dem Einbettungsreagenz Aqua Polymount (Polysciences, Warrington, USA) auf Objektträgern eingebettet.

Die Auswertung der Präparate erfolgte entweder am Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss Axio Observer, Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) oder am konfokalen Laser-scanning-Mikroskop (Leica TCS SP5 MP, Leica Mikrosysteme, Wetzlar). Helligkeit, Kontrast und Tonwert der fluoreszenzmikroskopisch erstellten Abbildungen wurden mit Hilfe der Adobe Photoshop CS4-Software (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) nachträglich justiert.

2.5.2 Messung der Zelllängen retroviral transduzierter Fibroblasten

Für die Messung der Zelllängen retroviral transduzierter Zellen wurden MEF am Vortag auf mit Poly-L-Lysin (0,001 %, Sigma Aldrich) beschichteten sterilen Deckgläschen (\varnothing 12 mm) in 24-Loch-Zellkulturplatten mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro An-

Tabelle 2.10 Verdünnung der Antikörper für Immunfluoreszenz

Prim. Antikörper	Verd.	Sek. Antikörper	Verd.
Paxillin	1:100	Maus, Cy5-gekoppelt	1:200
PML, clone 36.1-104	1:200		
Hämagglutinin (HA)	1:500	Kaninchen, Alexa 568-gekoppelt	1:500
TO-PRO3	1:2000		
Phalloidin-TRITC	1:2000		

satz ausgesät. Die Zellen wurden mit 10 IU/ Zelle der entsprechenden Retroviren in Anwesenheit von Protaminsulfat (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) transduziert. 72 Stunden nach Transduktion wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben, fixiert, gewaschen und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit Phalloidin-TRITC (1:2000) für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden mit Aqua Polymount (Polysciences, Warrington, USA) auf Objektträgern eingebettet. Am Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss Axio Observer) wurden zufällig ausgewählte Bereiche der Präparate fotografiert. Anschließend wurde mit Hilfe der Zeiss Axiovision-Software die maximale Zelllänge von mindestens 30 Zellen pro Retrovirus-Variante anhand der Phalloidin-TRITC-Signale gemessen. Der Median der Zelllängen wurde mit Hilfe der GraphPad Prism Software (GraphPad Software, La Jolla, USA) bestimmt.

2.5.3 Bestimmung der Anzahl der ND10 *domains* in Fibroblasten

Um die Anzahl der ND10 *domains* pro Zellkern zu bestimmen, wurden MEF auf beschichteten Deckgläschen ausgesät (siehe Abschnitt 2.5.1). Die Zellen wurden mit 10 IU/ Zelle der verschiedenen Retrovirus-Varianten in der Gegenwart von Protaminsulfat transduziert (siehe Abschnitt 2.8.3). Die Hälfte der Zellen wurde mit IFN β stimuliert. Hierzu wurde dem Zellkulturmedium 48 Stunden nach Transduktion 1.000 Units/ ml IFN β pro Ansatz zugegeben. Die Zellen wurden anschließend weitere 24 Stunden inkubiert.

Nach 72 Stunden wurden die Zellen, wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben, fixiert, permeabilisiert und mit einem PML-Antikörper und einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2.10) gefärbt. Analog dazu wurden nicht transduzierte Zellen gefärbt. Die Präparate wurden im Epifluoreszenzmikroskop fotografiert, wobei neben den PML-Signalen auch die GFP-Expression der transduzierten Zellen dokumentiert wurde. Aus zufällig ausgewählten Bereichen wurde die Anzahl der ND10 *domains* pro Zellkern von mindestens 30 GFP-exprimierenden Zellen bestimmt. Die Anzahl der ND10 *domains* pro

Zellkern von nicht transduzierten Zellen wurde auf gleiche Weise bestimmt. Anschließend wurde die durchschnittliche Anzahl an ND10 *domains* pro Zellkern für die untersuchten Retroviren errechnet.

2.6 Virologische Methoden

2.6.1 Infektion muriner Zellen mit MCMV

Für die Infektion wurde eine definierte Anzahl muriner Zellen, je nach Verwendungszweck, auf 6-Loch-Zellkulturplatten, Deckgläschen oder größere Zellkulturschalen ausgesät. Die für die Infektion benötigte Menge an Virus wurde in kaltem Zellkulturmedium auf die entsprechende MOI verdünnt. Das Medium wurde von den Zellen entfernt, und die verdünnte Virus-Suspension auf die Zellen gegeben. Bei späterer Verwendung für Immunoblots wurden die Zellen mit dem Virus für 45 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, um die Infektionseffizienz zu erhöhen. Anschließend wurden die Zellen zusammen mit dem Virus-Überstand für zwei bis drei Stunden inkubiert. Um nicht gebundene Viruspartikel zu entfernen, wurden die Zellen zwei Mal mit PBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von frischem Zellkulturmedium wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung kultiviert.

2.6.2 Herstellung von Virus-Stocks

Für die Herstellung von Virus-Stocks wurden MEF in zehn Zellkulturschalen (\varnothing 14,5 cm) ausgesät und kultiviert, bis eine 70- bis 80 %-ige Konfluenz der Zellen erreicht war. Die Zellen wurden mit ca. 0,01 PFU des zu vermehrenden Virus infiziert und kultiviert. Nachdem ein vollständiger cytopathischer Effekt bei allen Zellen im Durchlicht- oder Fluoreszenzmikroskop zu beobachten war, wurden die Zellen zusammen mit dem Überstand geerntet. Ggf. wurde der Überstand bei -80°C bis zu weiteren Verwendung gelagert und anschließend bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Durch Zentrifugation in einem Beckmann JA-10 Rotor bei 6.000 rpm und 4°C für 20 Minuten wurden die Zellbestandteile sedimentiert, und der Überstand wurde in sterile Ultra-Zentrifugenröhrchen überführt. Die im Überstand vorhandenen Viruspartikel wurden durch Zentrifugation für drei Stunden bei 13.000 rpm und 4°C in einem Beckmann Typ-19 Rotor sedimentiert. Das resultierende Virus-Pellet wurde über Nacht mit 5 ml Kulturmedium bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Pellet mit einem Hand-Homogenisator vollständig im Medium resuspendiert. Die Virus-Suspension wurde in Ultra-Zentrifugenröhrchen auf ein Saccharose-Kissen geschichtet und in einem Beckmann SW40Ti Rotor für eine Stunde bei 20.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Virus-Pellet in zwei ml gekühlter Saccharose-Lösung in einem Hand-Homogenisator resuspendiert.

Die Virus-Suspension wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Saccharose-Lösung:	Saccharose	15 % (w/v)
	TRIS/HCl pH 7,8	50 mM
	KCl	12 mM
	EDTA	5 mM

2.6.3 Virus-Titerbestimmung durch Plaque Assays

Die Titer von Virus-Überständen oder Virus-Stocks wurden auf MEF bestimmt. Diese wurden auf 48-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und bis zur Konfluenz inkubiert. Gefrorene Virus-Proben wurden bei 37°C im Wasserbad zügig aufgetaut und in vorgekühltem Zellkulturmedium ohne Serum- und Antibiotika-Zusatz verdünnt. In 96-Loch-Platten wurden Verdünnungsreihen von 1:10 bis 1:1x10⁹ hergestellt. 100 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe wurden in die 48-Loch-Zellkulturplatte überführt. Hierbei wurden für jede Verdünnungsstufe drei einzelne Ansätze hergestellt. Die infizierten Zellen wurden für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Viren samt Medium entfernt und die Zellen mit 500 µl Titrations-Medium bedeckt. Durch die Carboxymethylcellulose im Titrationsmedium sollte verhindert werden, dass sich Viruspartikel in der Zellkulturschale verteilen, so dass sich nur einzelne Plaques aus infizierten Zellen bilden konnten. Nach vier Tagen wurde die Anzahl der Plaques im Durchlichtmikroskop, oder im Falle von GFP-exprimierenden Virusvarianten, im Fluoreszenzmikroskop gezählt und die Anzahl der Plaque-bildenden Einheiten (PFU, Plaque Forming Units) pro ml berechnet.

Titration-Medium:	Carboxymethylcellulose	0,75 % (w/v)
	FCS	5 % (v/v)
	10x DMEM	10 % (v/v)
	Glutamin	2 mM
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin-Sulfat	100 µg/ ml
	d-Glucose	3,5 g/ l
	Folsäure	4 mg/ l
	Natrium-Bicarbonat	0,37 % (v/v)

2.6.4 Rekonstitution von Viruspartikeln aus BAC-DNA

Die Rekonstitution von Viruspartikeln erfolgte durch Transfektion von MEF mit BAC-DNA, die mit einem Nucleobond PC100-Kit (Macherey Nagel) aufgereinigt worden war (siehe Abschnitt 2.3.4). Die MEF wurden am Vortag mit einer Dichte von 5x10⁵ Zellen

pro Ansatz in einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. 10 μl (ca. 1 μg) der DNA wurden in einem Reaktionsgefäß mit 40 μl einer sterilen 150 mM NaCl-Lösung vermischt. 2 μl jetPEI-Transfektionsreagenz (Polyplus-Transfection, Illkirch, Frankreich) wurden in einem zweiten Reaktionsgefäß mit 48 μl 150 mM NaCl-Lösung verdünnt. Beide Ansätze wurden vereinigt, vorsichtig gemischt und 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Zellkulturmedium der MEF durch 1 ml frisches Medium ersetzt. Die Transfektionslösung wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 300 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Am folgenden Tag wurde 1 ml zusätzliches Kulturmedium zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden inkubiert, bis die Produktion von Viren im Durchlichtmikroskop oder Fluoreszenzmikroskop anhand von Plaquebildung und Zellabrundung bzw. GFP-Expression erkennbar wurde. Nach vollständiger Ausbreitung des cytopathischen Effekts in der Zellkultur wurden die Zellen mit dem Überstand geerntet und entweder bei -80 °C gelagert oder verwendet, um einen Virus-Stock herzustellen (siehe Abschnitt 2.6.2).

2.6.5 Virus-Replikationsanalysen

Für die Analyse der Virusreplikation wurden MEF mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro Ansatz auf 12-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Die Zellen wurden mit den zu analysierenden Virusvarianten mit einer MOI von 0,1 oder 1 infiziert. Hierzu wurde die entsprechende Menge an Virus-Stock in 800 μl Kulturmedium verdünnt. Die Zellen wurden für 3 Stunden mit dem Virus inkubiert. Anschließend wurde das Virus-Inokulum entfernt. Nicht gebundene Virus-Partikel wurden durch Waschen mit PBS-Puffer entfernt und pro Ansatz wurden 500 μl frisches Medium auf die Zellen gegeben. 100 μl des Überstandes wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Die entnommenen Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Virus-Titer der Überstände wurden anhand eines Plaque-Assays bestimmt (siehe Abschnitt 2.6.3).

Teilweise wurden die Zellen vor der Infektion für die Replikationsanalysen mit Interferon β (IFN β) präinkubiert. Hierfür wurden MEF wie oben beschrieben ausgesät. Gleichzeitig wurden dem Kulturmedium 1000 Units/ ml IFN β zugesetzt und bis zur Infektion 24 Stunden inkubiert. Zur Infektion wurden die Zellen für drei Stunden mit der entsprechenden Menge an Virus in 800 μl Kulturmedium inkubiert. Nach dem Entfernen des Virus-Inokulums und dem Waschen mit PBS-Puffer wurden dem Medium erneut 1000 Units/ ml IFN β zugesetzt. Das weitere Vorgehen entsprach dem oben beschriebenen Protokoll.

2.6.6 Präparation viraler DNA

MEF oder NIH 3T3-Zellen wurden auf einer Zellkulturschale (\varnothing 10 cm) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen mit dem zu analysierenden Virus mit einer geringen MOI infiziert (0,1 oder weniger). Die Zellen wurden bis zur vollständigen Infektion sämtlicher Zellen inkubiert und anschließend zusammen mit dem Überstand geerntet. Durch Einfrieren bei -80°C und zügiges Auftauen bei 37°C im Wasserbad wurden die Zellen aufgebrochen, und Zell-assoziierte Viruspartikel in den Überstand freigesetzt.

Die Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei $900 \times g$ und 4°C für 10 Minuten vom Überstand abgetrennt. Der Überstand wurde in Ultra-Zentrifugenröhrchen überführt und die Viruspartikel durch Zentrifugation in einem SW40Ti Rotor in der Ultrazentrifuge für eine Stunde bei 25.000 rpm und 4°C sedimentiert. Um zelluläre DNA zu entfernen, wurde das Virus-Pellet in Benzonase-Puffer resuspendiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 100 Units Benzonase inkubiert. Durch anschließende Zugabe von $20 \mu\text{l}$ EDTA-Lösung wurde die Benzonase deaktiviert. Die Virusmembranen wurden durch die Zugabe von $500 \mu\text{l}$ 1 % SDS lysiert und Kapsidproteine wurden durch die Zugabe von Proteinase K abgebaut. Durch Inkubation bei 56°C für mindestens 3 Stunden wurde hierbei die virale DNA freigesetzt.

Die virale DNA wurde mit PCI (Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1, pH 7,5-8,0 in TE-Puffer, Roth, Karlsruhe) extrahiert. Hierfür wurde ein Volumen der PCI-Lösung zugegeben, gemischt und bei 13.000 rpm (5417R Eppendorf-Zentrifuge) und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Die obere Phase, die die virale DNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut mit einem Volumen PCI-Lösung versetzt. Die Zentrifugation wurde wiederholt, die obere Phase in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) sowie $1 \mu\text{l}$ einer Glycogen-Lösung (35 mg/ml) zugesetzt. Die Präzipitation der viralen DNA erfolgte durch Zugabe von 0,8 x Volumen Isopropanol und anschließender Zentrifugation bei 13.200 rpm und 4°C für 30 Minuten in einer 5417R Eppendorf-Tischzentrifuge. Die DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in $100 \mu\text{l}$ TE-Puffer und RNase A gelöst. Für Restriktionsanalysen wurden 10 bis $30 \mu\text{l}$ der viralen DNA eingesetzt. Die DNA wurde bei 4°C gelagert.

Tabelle 2.11 Lösungen zur Präparation viraler DNA

Benzonase-Puffer:	TRIS/HCl pH 8,0	50 mM
	MgCl ₂	1 mM
	BSA	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
EDTA-Lösung:	EDTA pH 8,0	0,5 M
TE-Puffer und RNase A:	siehe Abschnitt 2.3.3	

2.7 Modifizierung von BACs durch Flp-vermittelte Rekombination

Die Herstellung der Virusmutanten MCMV-GFP M25HA und MCMV-GFP M25HA NLS-mut erfolgte durch die Modifizierung eines BACs mit Hilfe der Flp-vermittelten Rekombination. Über eine in der BAC-Sequenz vorhandene FRT-site wurde ein Shuttle-Plasmid (pOri), welches ebenfalls über eine FRT-site sowie über eine Kanamycin-Resistenz-Kassette verfügte, vollständig in das BAC integriert. Eine schematische Darstellung der Flp-vermittelten Rekombination ist in Abbildung 2.2 gezeigt. Hierzu wurde das bereits vorhandene BAC MCMV-GFP Δ M24-m25.2 verwendet, in dem durch Deletion dieser ORFs eine FRT-site verblieben war [Sengstake, 2009]. Die pOri-Shuttle-Plasmide wurden in *E. coli* PIR1-Bakterien propagiert, die durch die Expression des Bakteriophagen-Proteins λ pi die Replikation der pOri-Plasmide ermöglichten. Die durch Flp-vermittelte Rekombination hergestellten BACs sind in Tabelle 2.12 dargestellt.

Für die Flp-vermittelte Rekombination wurde eine 5 ml-Flüssigkultur mit Bakterien angeimpft, die das BAC MCMV-GFP Δ M24-m25.2 enthielten. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen wurden aus dieser Kultur elektrokompente Bakterien hergestellt (siehe Abschnitt 2.3.1).

Diese Bakterien wurden mit 5 ng des pST76A-Flp1-Plasmids, welches die Flp-Rekombinase temperaturabhängig exprimiert, transformiert. Im Anschluss wurden die Bakterien eine Stunde bei 30°C schüttelnd inkubiert. 20 μ l der Bakterienkultur wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen, welche Chloramphenicol und Ampicillin enthielten und über Nacht bei 30°C inkubiert (Abbildung 2.2 A, 1. Schritt). Mit einer Kolonie dieser Bakterien, welche nun das BAC MCMV-GFP Δ M24-m25.2 und das pST76A-Flp1-Plasmid enthielten, wurden 5 ml einer LB-Flüssigkultur unter Zugabe von Chloramphenicol und Ampicillin beimpft. Die Flüssigkultur wurde über Nacht bei 30°C schüttelnd inkubiert.

Nach Herstellung elektrokompenter Bakterien wurden diese mit 10 ng des pOri-Shuttle-Plasmids transformiert (Abbildung 2.2 A, 2. Schritt). Anschließend wurden die Bakterien in 500 μ l LB ohne Antibiotika für zwei Stunden bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Bei dieser Temperatur erfolgte die Expression der Flp-Rekombinase und die Integration des pOri-Plasmids in das BAC (Abbildung 2.2 B).

100 μ l der Bakterien-Suspension wurden auf LB-Agarplatten, die Chloramphenicol und Kanamycin enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 43°C inkubiert. Bei dieser Temperatur wurde die Replikation des pST76A-Flp1-Plasmids verhindert, so dass Kolonien aus Bakterien entstanden, welche nur das BAC MCMV-GFP Δ M24-m25.2 mit dem integrierten Shuttle-Plasmid enthielten (Abbildung 2.2 C). Mit einzelnen resultierenden Kolonien wurden 10 ml LB-Flüssigmedium (Chloramphenicol und Kanamycin) beimpft und die BAC-DNA aus den Bakterien isoliert. Die korrekte Integration des pOri-Plasmids wurde

durch Restriktionsanalysen überprüft. Von Klonen, die ein korrektes Restriktionsmuster zeigten, wurde eine größere Menge BAC-DNA isoliert. Zur Rekonstitution der modifizierten Viren wurde diese DNA in MEF eingebracht (siehe Abschnitt 2.6.4). Aus den entstandenen Virus-Patrikeln wurde virale DNA isoliert (siehe Abschnitt 2.6.6) und erneut durch Restriktionsanalysen untersucht. Anschließend wurden Virus-Stocks der modifizierten Viren MCMV-GFP M25HA und MCMV-GFP M25HA NLSmut hergestellt (siehe Abschnitt 2.6.2).

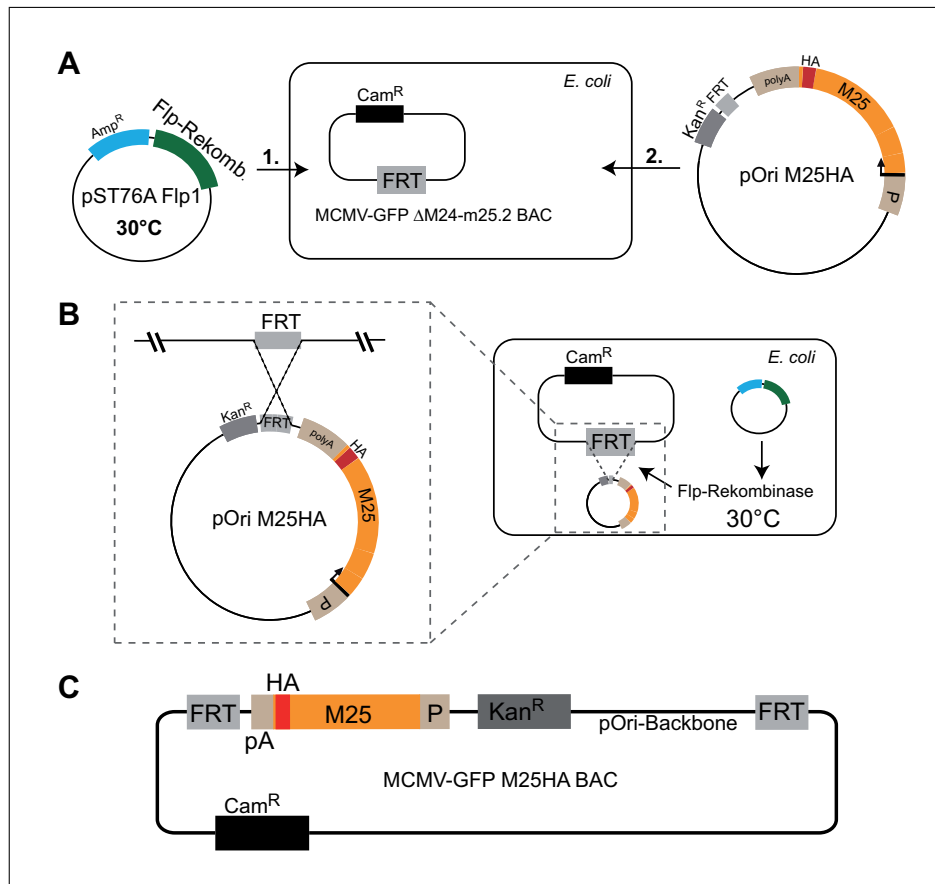


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der Flp-vermittelten Rekombination. Beispielhaft ist die Herstellung des BACs MCMV-GFP M25HA gezeigt. (A) Bakterien, die das BAC MCMV-GFP ΔM24-m5.2 enthalten, werden zuerst mit pST76A-Flp1 transformiert. Als zweiter Schritt erfolgt die Transformation mit pOri M25HA. (B) Durch Inkubation bei 30°C wird die Flp-Rekombinase vom Plasmid pST76A Flp1 exprimiert. Die Rekombinase vermittelt die Rekombination der FRT-sites im BAC und in pOri M25HA (Vergrößerter Ausschnitt). (C) Das modifizierte BAC MCMV-GFP M25HA enthält das gesamte pOri M25HA-Backbone, inklusive der Kanamycin-Resistenzkassette zwischen zwei FRT-Sites.

Tabelle 2.12 Durch Flp-vermittelte Rekombination hergestellte BACs

Ausgangs-BAC	Shuttle-Plasmid	Modifiziertes BAC
MCMV-GFP Δ M24-m25.2	pOri M25HA	MCMV-GFP M25HA
MCMV-GFP Δ M24-m25.2	pOri M25HA NLSmut	MCMV-GFP M25HA NLSmut

2.8 Herstellung retroviraler Expressionsvektoren

2.8.1 Klonierung der retroviralen Vektoren pSF M25-ATG2 und pSF M25-ATG6

Zur Herstellung retroviraler Vektoren wurde das retrovirale Expressionsplasmid pSF β 91-eGFP-wpre verwendet. Um die ORFs der M25-Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 in den Vektor pSF β 91-eGFP-wpre zu klonieren, wurden diesem zwei Restriktionsschnittstellen hinzugefügt. Hierfür wurde die Quick Mutagenese PCR verwendet (siehe Abschnitt 2.3.11). Mit Hilfe der Primer pSFbeta91Mfe.for und pSFbeta91Age.rev wurden eine MfeI- und eine AgeI-Restriktionsschnittstelle zwischen die 5'LTR-Region und die interne Ribosomenbindestelle (IRES) eingefügt. Hierdurch entstand der Vektor pSF β 91-eGFP-AgeI-MfeI. Die Strategie zur Herstellung der retroviralen Vektoren ist in Abbildung 3.5 schematisch dargestellt.

Die Sequenzen für M25-ATG2 und M25-ATG6 wurden aus dem Plasmid pIRES AcGFP M25CHA mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden am 5'-Ende eine AgeI-Restriktionsschnittstelle und eine Kozak-Sequenz, am 3'-Ende eine MfeI-Schnittstelle angefügt. Die Primer ATG2Age.for und ATG6Age.for banden direkt an den jeweiligen Startcodons im M25 ORF. Der Primer M25Mfe.rev wurde für die Amplifikation beider Sequenzen verwendet, wobei die im Plasmid pIRES AcGFP M25CHA bereits vorhandene C-terminale HA-Markierung mit amplifiziert wurde. Die Sequenzen aller verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt.

Vektor und beide PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen AgeI und MfeI geschnitten (siehe Abschnitt 2.3.6). Anschließend wurde der Vektor dephosphoryliert (siehe Abschnitt 2.3.8) und die PCR-Produkte mit dem Vektor ligiert. *E. coli*-Bakterien wurden mit je 2 ng der ligierten Plasmid-DNA transformiert (siehe Abschnitt 2.3.2). Die Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Die DNA der so entstandenen Plasmide pSF M25-ATG2 und pSF M25-ATG6 wurde aus mehreren Bakterienkolonien isoliert (siehe Abschnitt 2.3.3) und durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung überprüft.

2.8.2 Produktion von Retroviren

Zur Herstellung von Retroviren wurden neben den pSF-Vektoren zwei weitere Plasmide benötigt. Das K73 pEF1-EcoEnv-IRES(EMCV)-puro-Plasmid codiert für ein ecotropes Hüll-Glykoprotein des *Vesicular Stomatitis* Virus, welches die Transduktion muriner Zellen ermöglicht. Das M57DAW-Plasmid exprimiert gag/pol-Proteine des *Moloney murine leukemia* Virus (MLV). Die Retrovirus-Produktionszelllinie Phoenix gp exprimiert ebenfalls MLV-gag/pol-Proteine. Durch die Verwendung dieser Zellen sollte die Produktion der retroviralen Vektoren unterstützt werden. Die in dieser Arbeit hergestellten Retroviren sind in Tabelle 2.13 dargestellt. Für die Produktion von Retroviren wurden am Vortag 3×10^6 Phoenix gp-Zellen auf einer Zellkulturschale (\varnothing 10cm) ausgesät. Die Transfektion der Phoenix gp-Zellen erfolgte mit einem Calcium-Phosphat Transfektions-Kit (Sigma Aldrich) nach modifizierten Bedingungen.

In einem Reaktionsgefäß wurden die drei für die Herstellung der Retroviren benötigten Plasmide mit deionisiertem sterilen Wasser zu einem Endvolumen von 438 μ l verdünnt. Von den Plasmiden pSF M25-ATG2 bzw. M25-ATG6 wurden 5 μ g pro Ansatz verwendet, von M57DAW 15 μ g pro Ansatz und von K73 pEF1 -EcoEnv-IRES(EMCV)-puro 2,5 μ g pro Ansatz. Zu den verdünnten Plasmiden wurden 62 μ l einer sterilen CaCl_2 -Lösung zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Plasmid-Lösung wurde tropfenweise zu 500 μ l einer zweifach konzentrierten HEPES-gepufferten Salzlösung (2x HeBS) gegeben. Anschließend wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde das Medium von den Phoenix gp-Zellen entfernt und durch 9 ml frisches Phoenix-Kulturmedium (siehe Abschnitt 2.2.1) ersetzt. Durch Zugabe von 25 μ M Chloroquin (Endkonzentration) sollte die Degradation der durch Endocytose aufgenommenen DNA durch eine Erhöhung des pH-Werts in den Lysosomen verhindert, und hiermit die Transfektionseffizienz gesteigert werden [Luthman and Magnusson, 1983].

Der Transfektionsansatz wurde langsam auf die Zellen getropft und diese für 6 bis 14 Stunden mit dem Transfektionsansatz inkubiert. Dann wurde der Überstand entfernt und 10 ml frisches Phoenix-Kulturmedium zugegeben. Nach 12 Stunden wurde das Medium erneut gewechselt. Nach weiterer Inkubation für 12 Stunden (insgesamt ca. 36 Stunden nach Transfektion) wurde der Überstand vorsichtig von den Zellen abgenommen, durch einen 0,22 μ m Filter (Millipore SLGP033RB, Billerica, USA) filtriert und in 2 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Überstände wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Nach weiteren 12 Stunden (48 Stunden nach Transfektion) wurde erneut der Überstand entnommen, filtriert und eingefroren. Weitere Überstände wurden 60 und 72 Stunden nach Transfektion geerntet, filtriert und eingefroren.

Tabelle 2.13 Retrovirale Vektoren

Retrovirus	Eigenschaft
pSF β 91-eGFP	„leerer“ Vektor, exprimiert GFP
pSF modb7-2	Kontroll-Vektor, exprimiert das MCMV-Protein modb7-2
pSF M25-ATG2	exprimiert den M25-ATG2 ORF
pSF M25-ATG6	exprimiert den M25-ATG6 ORF
pSF ATG6 NLSmut	Mutation des NLS im M25-ATG6 ORF
pSF ATG6 SIM2mut	Mutation des SIM2 im M25-ATG6 ORF
pSF ATG6 SIM3mut	Mutation des SIM3 im M25-ATG6 ORF
pSF ATG6 SIM4mut	Mutation des SIM4 im M25-ATG6 ORF

2.8.3 Retrovirale Transduktion

Zur Transduktion mit retroviralen Vektoren wurden die Zielzellen, je nach Bedarf, in 6-Loch-Zellkulturplatten oder auf Deckgläschen in 12-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Die Retrovirus-Überstände wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend mit kaltem Zellkulturmedium auf die benötigte Konzentration (IU/ml) eingestellt. Den Retrovirus-Überständen wurde Protaminsulfat (4 μ g/ ml, in PBS-Puffer) zugesetzt, welches durch Neutralisierung der positiven Ladungen auf der Zellmembran den Eintritt der Retroviren in die Zellen erleichtern und so die Transduktionseffizienz steigern sollte. Die Zellen wurden mit den Retrovirus-Überständen für 12 Stunden inkubiert. Anschließend wurde zusätzlich frisches Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben und für weitere 60 Stunden bis zur Verwendung inkubiert.

2.8.4 Bestimmung retroviraler Titer

Die Titer der verschiedenen Retrovirus-Überstände wurden anhand der GFP-Expression in transduzierten Zellen im Durchflussscytometer bestimmt. Hierzu wurden NIH 3T3-Zellen mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Ansatz in einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit jeweils 10 und 100 μ l der verschiedenen Überstände transduziert. Hierfür wurden die Überstände zügig im Wasserbad aufgetaut und in einem Reaktionsgefäß mit Kulturmedium auf ein Endvolumen von 800 μ l eingestellt. Den Virusüberständen wurde Protaminsulfat (4 μ g/ ml) zugesetzt. Das Kulturmedium wurde von den Zellen entfernt und die Retrovirus-Überstände vorsichtig auf die Zellen gegeben. Zur Bestimmung der Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion wurden nicht-transduzierte Zellen aus einem Kontrollansatz durch Trypsin-Behandlung abgelöst

und die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.3).

Nach 12 Stunden wurden 2 ml Kulturmedium pro Ansatz zugegeben. Die Zellen wurden anschließend noch weitere 60 Stunden mit den Retrovirus-Überständen inkubiert. Nach insgesamt 72-stündiger Transduktionszeit wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen durch Trypsin-Behandlung von der Kulturplatte abgelöst. Die Zellen wurden in 1 ml Kulturmedium pro Ansatz aufgenommen und in Reaktionsgefäße überführt. Durch Zentrifugation bei 300 x g und 4°C für 5 Minuten wurden die Zellen sedimentiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen in 500 μ l kaltem PBS-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Puffer entfernt und die Zellen in 300 μ l PBS-Puffer mit 2 mM EDTA resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in Durchflusscytometrie-Röhrchen überführt und mit 300 μ l 3 % PFA in PBS-Puffer fixiert. Der prozentuale Anteil der GFP-exprimierenden Zellen wurde im Durchflusscytometer bestimmt. Anhand der Anzahl transduzierter Zellen und dem prozentualen Anteil GFP-exprimierender Zellen wurde der retrovirale Titer als *Infectious Units* (IU) pro ml Überstand errechnet.

KAPITEL 3

ERGEBNISSE

3.1 Virale Proteinexpression und Replikation nach Infektion mit einem MCMV Δ M25-Virus

Eine MCMV-Infektion löst in infizierten Zellen bereits 4 Stunden nach Infektion (h p.i.) eine Veränderung der Zellmorphologie aus, die 48 h p.i. zur vollständigen Abrundung der betroffenen Zellen führt (siehe Kapitel 1.3). Nach einer Infektion mit einer M25-Deletionsmutante behalten die Zellen dagegen die ursprüngliche Morphologie nicht infizierter Zellen bei [Sengstake, 2009]. Um den Einfluss von M25-Genprodukten auf MCMV-infizierte Zellen zu untersuchen, wurden murine Fibroblasten (MEF und NIH 3T3) mit dem GFP-exprimierenden Wildtyp-Virus MCMV-GFP und mit der GFP-exprimierenden M25-Deletionsmutante MCMV-GFP Δ M25 infiziert. Die Expression viraler Proteine wurde in MCMV-GFP- und MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen miteinander verglichen. Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluss M25-Genprodukte auf die Replikationsfähigkeit des Virus haben. Hierfür wurden murine Fibroblasten mit MCMV-GFP und MCMV-GFP Δ M25 infiziert und die Replikationsfähigkeit beider Virus-Varianten miteinander verglichen.

3.1.1 Expression viraler Proteine während einer MCMV Δ M25-Infektion

Um zu überprüfen, ob die Deletion des M25-Gens einen Einfluss auf die Expression viraler Proteine ausübt, wurden die charakteristischen Phasen der viralen Proteinexpression *immediate early*, *early* und *late* in einer Kinetik beobachtet. Hierfür wurden aus MCMV-GFP-infizierten, MCMV-GFP Δ M25-infizierten und nicht infizierten NIH 3T3-Zellen hergestellte Proteinlysate, die in den verschiedenen Phasen der Infektion geerntet

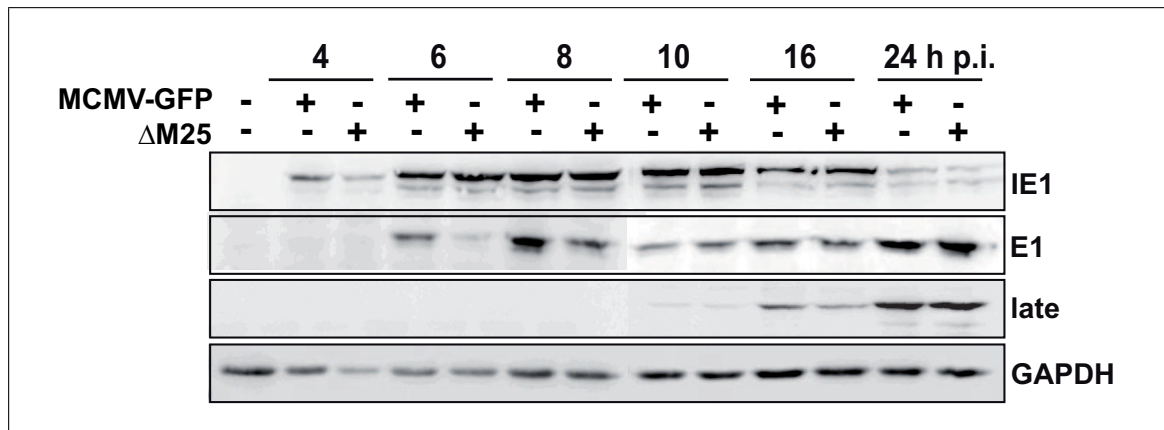


Abbildung 3.1 Einfluss von M25-Proteinen auf die virale Proteinexpression. NIH 3T3-Zellen wurden mit MCMV-GFP oder MCMV-GFP Δ M25 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, lysiert, die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Expression der viralen Proteine IE1, E1, late (20/352/4) sowie die des zellulären Proteins GAPDH als Kontrolle der geladenen Proteinmenge wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert.

worden waren, gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrocellulose-membran übertragen (siehe Abschnitt 2.4.1 bis 2.4.4). Anschließend wurde die Expression der Proteine IE1 (*immediate early*), E1 (*early*) und 20/352/4, welches ein bisher uncharakterisiertes spätes MCMV-Protein darstellt, analysiert.

Bereits 4 h p.i. waren IE1-Proteine detektierbar (Abbildung 3.1). Dabei war die Expression in MCMV-GFP-infizierten Zellen geringfügig stärker als die in MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen, allerdings ließ sich anhand der GAPDH-Ladekontrolle erkennen, dass eine kleinere Menge an Proteinen in dieser Spur geladen worden war. 6 h p.i. war kein wesentlicher Unterschied mehr in der Expression von IE1-Proteinen zu beobachten. Die IE1-Expression blieb bis 10 h p.i. auf etwa gleichbleibendem Niveau und nahm dann in MCMV-GFP- wie in MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen ab.

Das E1-Protein war in MCMV-GFP-infizierten Zellen 6 h p.i. detektierbar, auch in MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen war zu diesem Zeitpunkt ein schwaches Signal zu erkennen. 8 h p.i. wurde das E1-Protein auch in MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen stärker exprimiert, jedoch weiterhin schwächer als in MCMV-GFP-infizierten Zellen. Ab 10 h p.i. war die E1-Expression in beiden Proben vergleichbar, was sich auch zu späteren Messzeitpunkten nicht änderte.

Das späte 20/352/4-Protein war sowohl in MCMV-GFP-infizierten Zellen als auch in MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen 10 h p.i. als äußerst schwache Bande detektierbar. 16 h p.i. war die Expression des späten Virusproteins in den MCMV-GFP-infizierten Zellen etwas stärker, 24 h p.i. konnte kein Unterschied mehr zwischen MCMV-GFP- und MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen beobachtet werden.

Bei allen drei untersuchten viralen Proteinen war somit eine geringfügig frühere Expression durch MCMV-GFP-infizierte Zellen erkennbar. Die Unterschiede waren nur zu Beginn der Expression der jeweiligen Proteine zu erkennen.

3.1.2 Einfluss der M25-Genprodukte auf die Replikation von MCMV

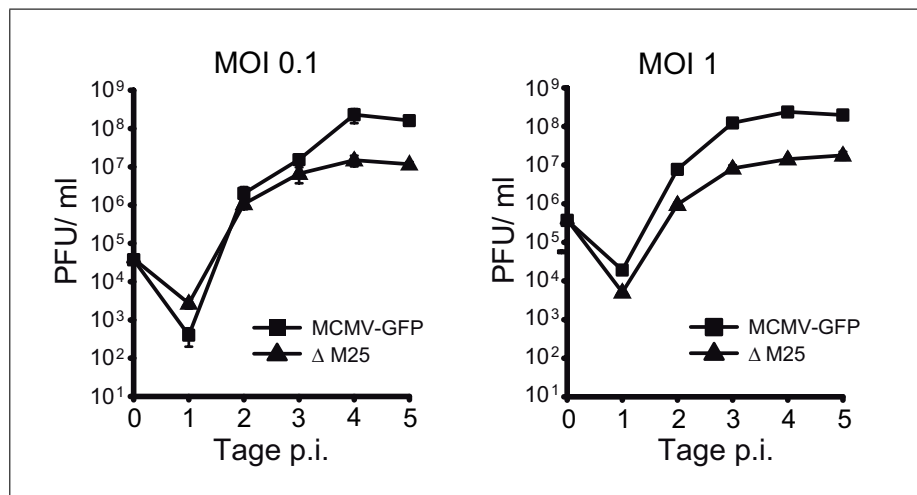


Abbildung 3.2 Einfluss von M25-Proteinen auf die virale Replikation. MEF wurden mit MCMV-GFP oder MCMV-GFP Δ M25 mit einer MOI von 0,1 (links) und 1 (rechts) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die viralen Titer im Überstand durch Plaque Assays auf MEF bestimmt. Die Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichung von drei unabhängigen Bestimmungen des Virustiters.

Mit Replikationsanalysen (siehe Abschnitt 2.6.5) wurde untersucht, ob die M25-Genprodukte eine essentielle Funktion bei der Virusreplikation ausüben. Hierfür wurden murine Fibroblasten (MEF) mit MCMV-GFP und mit MCMV-GFP Δ M25 infiziert. Es wurde die Replikation der Virusvarianten nach Infektion mit einer hohen Multiplizität der Infektion (MOI) von 1 sowie mit einer niedrigen MOI (0,1) untersucht. Die viralen Titer wurden im Abstand von 24 h in einem Zeitraum von einem bis fünf Tagen nach Infektion bestimmt.

Bei einer MOI von 0,1 (Abbildung 3.2, linke Seite) war bis zum dritten Tag nach Infektion kein wesentlicher Unterschied in den viralen Titern von MCMV-GFP und MCMV-GFP Δ M25 zu beobachten. An den Tagen vier und fünf jedoch zeigte MCMV-GFP ca. 40- bis 50-fach höhere virale Titer als MCMV-GFP Δ M25.

Bei einer MOI von 1 (Abbildung 3.2, rechte Seite) waren vom zweiten Tag nach Infektion an Unterschiede zwischen den viralen Titern von MCMV-GFP und MCMV-GFP Δ M25 detektierbar. Die bis zum fünften Tag nach Infektion gemessenen viralen Titer von

MCMV-GFP waren im Vergleich zu denen von MCMV-GFP Δ M25 um einen Faktor von ca. 50 erhöht. Es konnte somit zwar kein schwerer Replikationsdefekt des MCMV-GFP Δ M25-Virus beobachtet werden, allerdings führte die Deletion des M25 ORFs zu einer verringerten Virusreplikation.

3.2 Lokalisation der M25-Proteine während der MCMV-Infektion

Um die Funktionsweise von M25-Proteinen in der Virusinfektion besser zu verstehen, wurde die subzelluläre Lokalisation von M25-Proteinen in MCMV-infizierten Zellen untersucht. Durch die Herstellung der Virusvariante MCMV-GFP M25HA wurden M25-Proteine mit einem Hämagglutinin-(HA)-Epitop gekennzeichnet. Dies ermöglichte eine Detektion von M25-Proteinen und deren Verfolgung in den subzellulären Kompartimenten infizierter Zellen mit Hilfe HA-spezifischer Antikörper. Durch die gleichzeitige Expression von GFP durch MCMV-GFP M25HA war eine einfache Detektion infizierter Zellen möglich.

3.2.1 Herstellung eines GFP exprimierenden M25HA-Virus

Zur Detektion von M25-Proteinen mittels eines spezifischen Antikörpers wurde der M25 Open Reading Frame (ORF) mit einem HA-Epitop modifiziert, welches unmittelbar vor dem Stop-Codon eingefügt wurde (Abbildung 3.3). Sämtliche M25-Proteine wurden somit an ihrem C-terminalen Ende mit einem HA-Epitop markiert (siehe Abschnitt 2.7). Zunächst wurde die Sequenz für das HA-Epitop mit einer Quick Mutagenese PCR (Abschnitt 2.3.11) in das bereits bestehende Plasmid pOri M25 eingebracht [Sengstake, 2009], das den gesamten M25 ORF unter Kontrolle des viruseigenen Promotorbereichs trug (Abbildung 3.3 A). Das so entstandene Plasmid pOri M25HA (Abbildung 3.3 B) wurde mittels Restriktionsanalysen und Sequenzierung auf die korrekte Beschaffenheit der Sequenz überprüft.

Zur weiteren Herstellung wurde ein bereits existentes *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) genutzt, dessen M25 ORF sowie die umgebenden Gene von M24 bis m25.2 deletiert (MCMV-GFP Δ M24-m25.2) und durch eine Kanamycin-Resistenz-Kassette ersetzt worden waren. Nach Entfernung der Kanamycin-Resistenz-Kassette war in dem BAC eine einzelne FRT-Site verblieben, die nun zur Flp-Rekombinase-vermittelten Insertion des modifizierten M25 ORFs genutzt wurde (siehe Abbildung 3.3 C und D sowie Abschnitt 2.7) [Sengstake, 2009].

Nach Insertion von pOri M25HA in den MCMV-GFP Δ M24-m25.2-BAC wurde die rekombinante BAC-DNA aus den Bakterien isoliert und mit Restriktionsanalysen über-

prüft (siehe Abschnitt 2.3.4 und 2.3.7). BAC-DNA, die ein korrektes Restriktionsmuster aufwies, wurde aus einem Bakterienklon isoliert und mit einem Transfektionsreagenz in MEF eingebracht (Abschnitt 2.6.4). Durch Expression der MCMV-Proteine entstanden in MEF infektiöse Viren (MCMV-GFP M25HA), die weitere Zellen infizierten und sich in der Zellkulturschale ausbreiteten. Sowohl BAC-transfizierte als auch MCMV-GFP M25HA-infizierte Zellen konnten anhand ihrer GFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch von nicht infizierten Zellen unterschieden werden. Um die Integrität der eingeführten HA-Epitop-Mutation in den Viruspartikeln zu überprüfen, wurde virale DNA präpariert und die korrekte Beschaffenheit der Sequenz mit Restriktionsanalysen belegt (siehe Abschnitt 2.6.5).

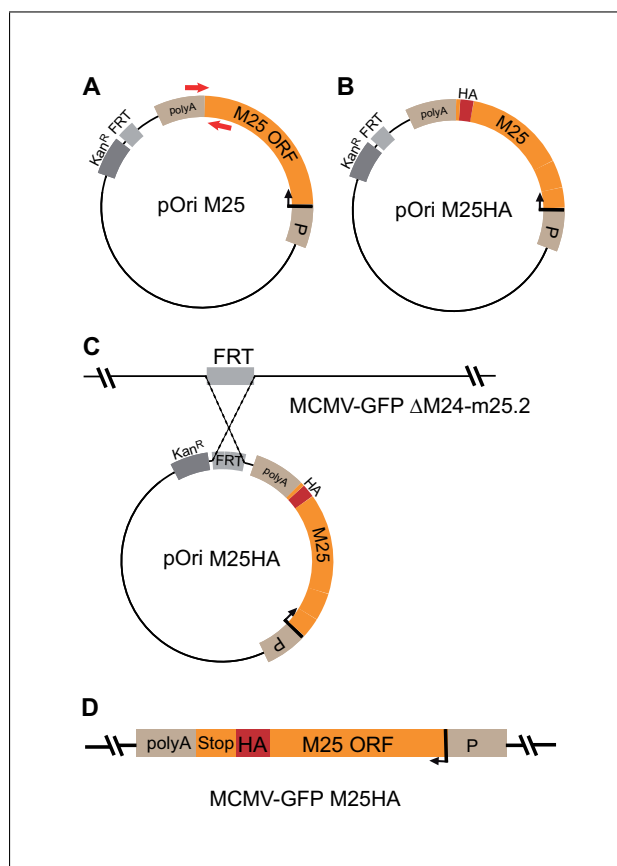


Abbildung 3.3 Schematische Darstellung der Herstellung von MCMV-GFP M25HA. (A) Shuttle-Plasmid pOriM25 mit dem M25 ORF unter Kontrolle des viruseigenen Promotorbereichs und polyA-Sequenz. Das Plasmid trägt eine Kanamycin-Resistenzkassette sowie eine FRT-Site. Die Primerbindungsstellen für das Einfügen der HA-Sequenz sind durch rote Pfeile gekennzeichnet. (B) zeigt das modifizierte Shuttle-Plasmid pOri M25HA. Die HA-Sequenz wurde unmittelbar vor dem Stop-Codon des M25 Gens integriert. (C) FLP-Rekombinase-vermittelte Integration von pOriM25HA in das BAC MCMV-GFP ΔM24-m25.2. Das Shuttle-Plasmid wird vollständig über die in Plasmid und BAC vorhandenen FRT-Sites in das Virusgenom inseriert. (D) Schematische Darstellung der integrierten M25HA-Kassette im BAC MCMV-GFP M25HA.

3.2.2 Subzelluläre Lokalisation von M25-Proteinen während der MCMV-Infektion

Mit der MCMV-GFP M25HA-Virusvariante wurde die subzelluläre Lokalisation von M25-Proteinen im Verlauf einer MCMV-Infektion untersucht. Vorversuche ergaben, dass M25-

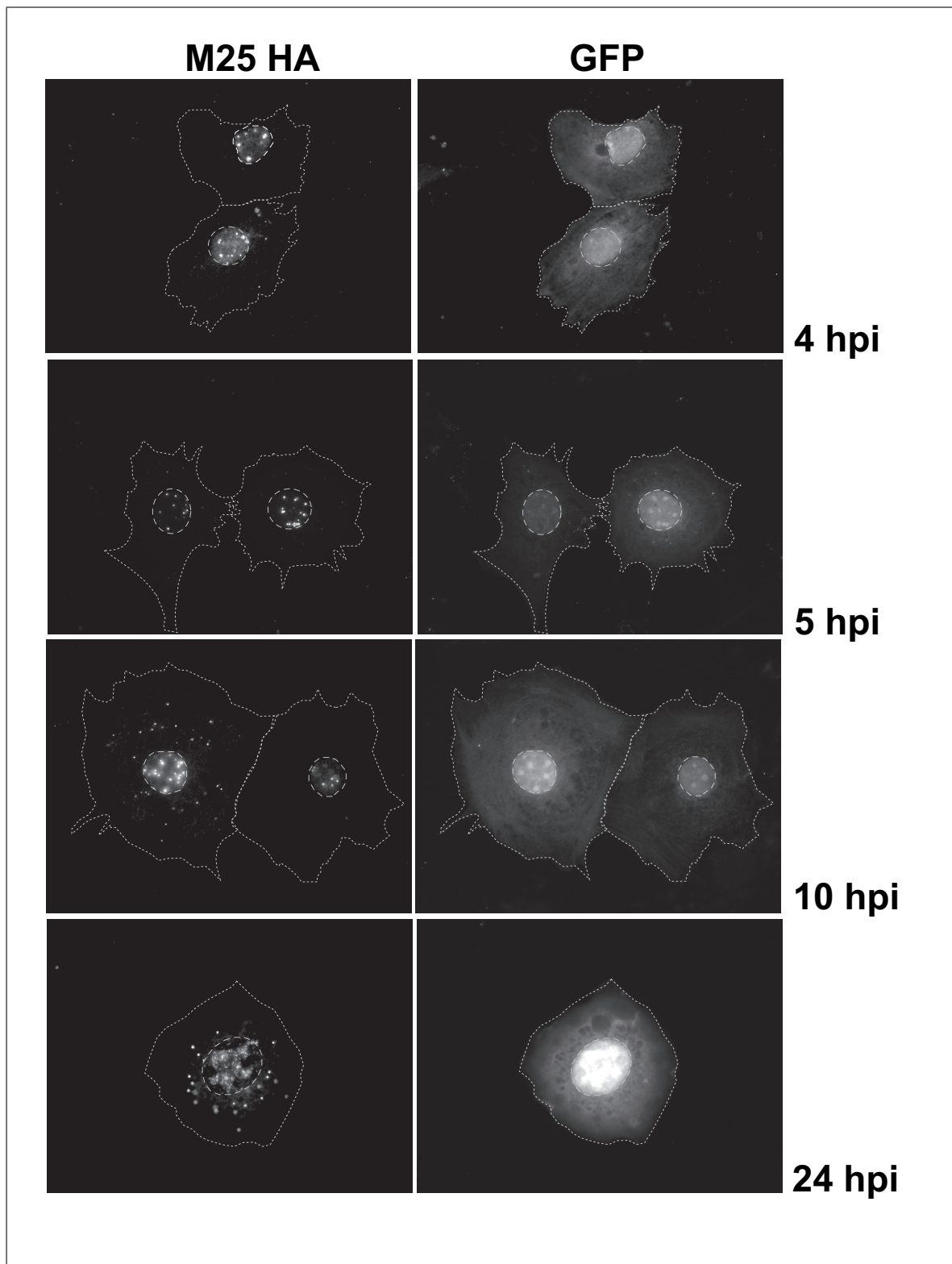


Abbildung 3.4 Subzelluläre Lokalisation der M25HA-Proteine im Verlauf der MCMV-Infektion. MEF wurden mit MCMV-GFP M25HA infiziert und die subzelluläre Lokalisation der M25-Proteine mit einem HA-spezifischen Antikörper 4, 5, 10 und 24 h p.i. detektiert. Die Analyse erfolgte im Epifluoreszenzmikroskop.

Proteine erst zu einem Zeitpunkt von ca. 3 h p.i. fluoreszenzmikroskopisch detektierbar waren. Daher wurde die Lokalisation von M25-Proteinen von einem Zeitpunkt 4 h p.i. über den gesamten Verlauf eines Replikationszyklus verfolgt (siehe Abschnitt 1.1.3). MEF wurden mit MCMV-GFP M25HA infiziert. 4, 5, 10 und 24 h p.i. wurden die Zellen fixiert und M25HA-Proteine mit einem HA-spezifischen Antikörper detektiert (siehe Kapitel 2.5). Infizierte Zellen wurden anhand ihrer GFP-Expression identifiziert.

4 h p.i. lagen M25-Proteine als kreisförmige Strukturen heterogener Größe im Zellkern vor, daneben war eine diffuse Verteilung von M25-Proteinen im Zellkern zu beobachten (Abbildung 3.4). Ein wesentlich kleinerer Anteil an M25-Proteinen war im Cytoplasma detektierbar, wo sowohl kleinere kreisförmige Strukturen als auch diffuse M25-Proteine detektiert wurden.

5 h p.i. waren M25-Proteine fast ausschließlich in kreisförmigen Strukturen im Zellkern lokalisiert, eine diffuse Verteilung der M25-Proteine war nicht mehr zu erkennen.

10 h p.i. intensivierten sich die punktförmigen M25-Signale im Zellkern. Auch im Cytoplasma konnten jetzt vermehrt punktförmige M25-Signale beobachtet werden. Innerhalb des Zellkerns, sowie um den Zellkern herum verdichtete sich zusätzlich wieder ein diffuses M25 Signal. 24 h p.i. vergrößerten sich die punktförmigen M25-Strukturen im Cytoplasma im Vergleich zu 10 h p.i. deutlich. Im Zellkern dagegen erschien eine deutliche Kompartimentierung der M25-Proteine, wobei diese zum Teil in kleinen Punktstrukturen und zum Teil diffus verteilt vorlagen.

Die M25-Proteine befanden sich im Verlauf der Infektion in unterschiedlichen Zellkompartimenten, durchgehend war jedoch eine nukleäre Lokalisation vorherrschend. Ein Großteil der M25-Proteine zeigte während des gesamten Infektionszyklus eine nukleäre Lokalisation in kreisförmigen Strukturen heterogener Größe. Vornehmlich in späteren Phasen der Infektion konnten auch im Cytoplasma M25-Proteine detektiert werden.

3.3 Expression von MCMV M25-Proteinen durch retrovirale Vektoren

Vorhergehende Versuche ergaben, dass MEF nach einer Infektion mit MCMV-GFP Δ M25 keine Abrundung zeigten, sondern ihre ausgestreckte Form beibehielten (siehe Kapitel 1.3). Durch Re-Insertion des M25 ORFs in eine Deletionsmutante, der der Bereich von M24 bis m25.2 fehlte (MCMV-GFP Δ M24-m25.2), konnte der cytopathische Effekt der Zellabrundung nach einer MCMV-Infektion wiederhergestellt werden [Sengstake, 2009]. Die durch das M25-Gen codierten Proteine sind somit essentiell für morphologische Veränderungen während einer MCMV-Infektion.

Ob die morphologischen Veränderungen infizierter Zellen aber allein durch die Anwesenheit von M25-Proteinen induziert werden, oder ob weitere virale Faktoren an diesem Effekt beteiligt sind, war hierdurch nicht geklärt worden. Durch die alleinige Expression von M25-Proteinen in murinen Zellen sollte daher untersucht werden, ob M25-Proteine unabhängig von einer MCMV-Infektion in der Lage sind, morphologische Veränderungen zu verursachen.

Die Expression des M25 ORFs resultiert in mehreren Proteinspezies, welche mittels unterschiedlicher Startcodons in der M25 Sequenz translatiert werden (siehe Abschnitt 1.3.2). Um die Funktion dieser unterschiedlichen Proteine zu untersuchen, wurden das 130 kDa Protein M25-ATG2 und das 105 kDa Protein M25-ATG6 einzeln exprimiert. Es sollte festgestellt werden, ob Unterschiede in der subzellulären Lokalisation der beiden M25-Proteine bestehen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob isoliert exprimierte M25-Proteine in der Lage sind, morphologische Veränderungen in Zellen auszulösen.

3.3.1 Herstellung retroviraler Vektoren zur Expression von M25-Proteinen

Die Sequenzen von M25-ATG2 und M25-ATG6 wurden inklusive des C-terminalen HA-Tags aus dem Plasmid pIRES AcGFP M25CHA amplifiziert (Abbildung 3.5 C). Am 5'-Ende des PCR-Produkts wurde eine AgeI-Restriktionsschnittstelle gefolgt von einer Kozak-Sequenz eingefügt und am 3'-Ende eine MfeI-Schnittstelle angefügt (Abbildung 3.5 D). Hierzu passende Restriktionsschnittstellen wurden in den retroviralen Expressionsvektor pSF β 91-eGFP (Abbildung 3.5 A) mittels einer Quick Mutagenese PCR eingefügt (Abbildung 3.5 B). Dieser Vektor beinhaltet eine „internal ribosome entry site“ (IRES), gefolgt von der Sequenz für das „enhanced green fluorescent protein“ (eGFP) (vgl. Abschnitt 2.8.1).

Die für M25-ATG2 und M25-ATG6 codierenden Sequenzen wurden über AgeI- und MfeI-Schnittstellen in den modifizierten retroviralen Expressionsvektor pSF β 91-eGFP-AgeI-MfeI kloniert (siehe Abschnitt 2.8.1). Durch die Positionierung der beiden M25 ORFs vor die IRES werden die M25-Proteine und das eGFP von einer bicistronischen mRNA synthetisiert, so dass M25-exprimierende Zellen durch die Expression von eGFP detektiert werden konnten.

Neben den so entstandenen Vektoren pSF M25-ATG2 und pSF M25-ATG6 (Abbildung 3.5 E) wurden zwei Kontroll-Vektoren für die Herstellung der Retroviren verwendet. Der „leere“ Vektor pSF β 91-eGFP exprimiert ausschließlich eGFP. Als zweite Kontrolle sollte die Expression eines an morphologischen Veränderungen unbeteiligten MCMV-Proteins dienen. Hierfür wurde das modb7-2-Protein gewählt, welches durch das MCMV-Gen

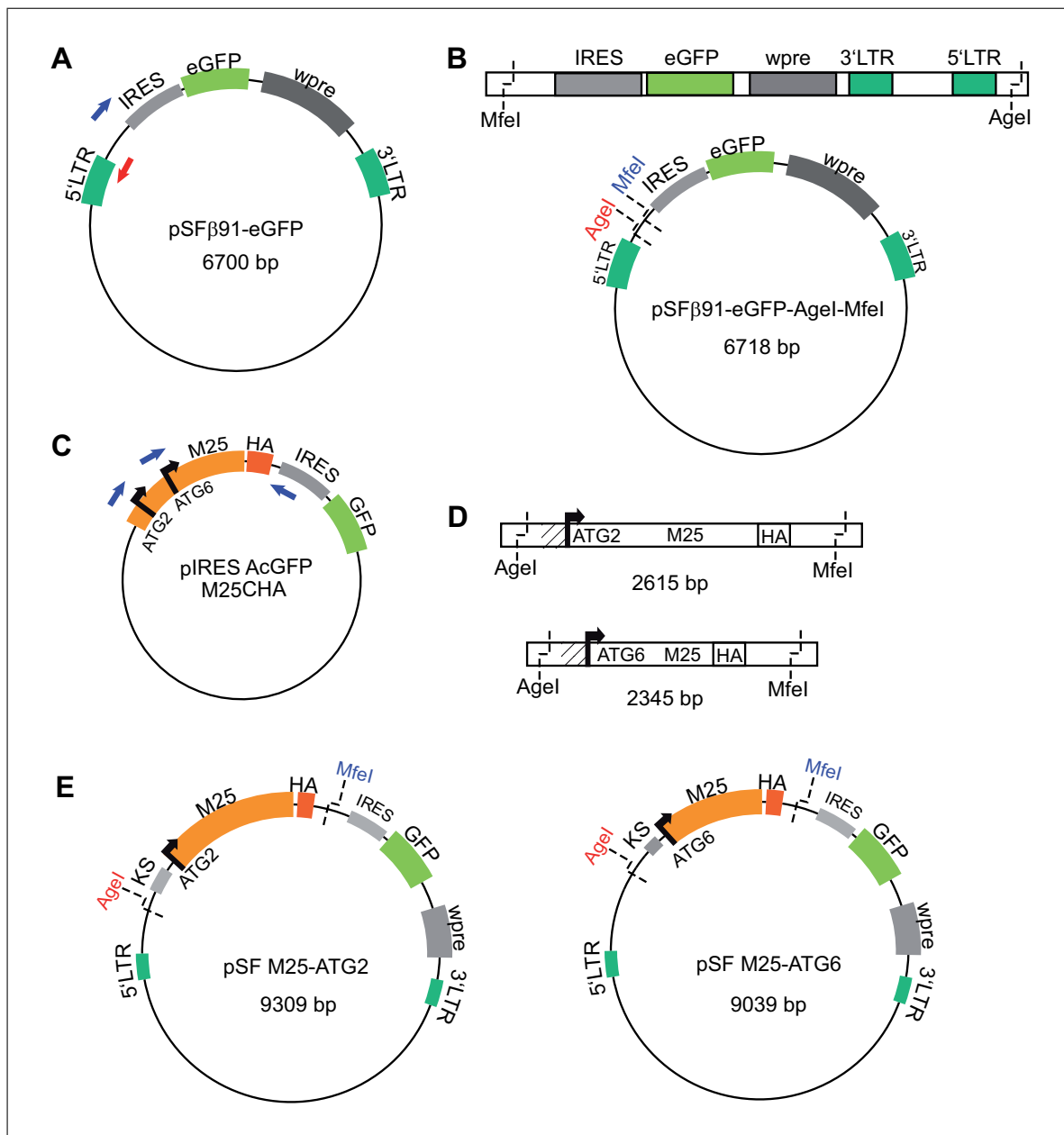


Abbildung 3.5 Klonierungsstrategie zur Herstellung von retroviralen Expressionsvektoren. In das retrovirale Expressionsplasmid pSF β 91-eGFP (A) wurden mit Hilfe einer Quick Mutagenese PCR die Restriktionsschnittstellen AgeI und MfeI eingefügt. Das lineare PCR-Produkt (B) wurde zum modifizierten Plasmid pSF β 91-eGFP-AgeI-MfeI ligiert. Die ORFs für M25-ATG2 und M25-ATG6 wurden inklusive der Sequenz für die HA-Markierung aus dem Plasmid pIRES AcGFP M25CHA (C) amplifiziert. Die Positionen der verwendeten Primer sind durch Pfeile gekennzeichnet. Über diese Primer wurden die Schnittstellen AgeI und MfeI angefügt (D). Anschließend wurden die M25 ORFs in das modifizierte Plasmid pSF β 91-eGFP-AgeI-MfeI über die AgeI- und MfeI-Schnittstellen integriert und es entstanden pSF M25-ATG2 und pSF M25-ATG6.

m147.5 codiert wird. Der für das modb7-2-Proteine codierende Expressionsvektor pSF modb7-2 wurde freundlicherweise von Pen Kay-Jackson zur Verfügung gestellt.

Die Herstellung der vier Retroviren erfolgte in Phoenix-Zellen (siehe Abschnitt 2.8.2). Um eine spätere Transduktion muriner Zellen zu ermöglichen, wurde ein Plasmid kointransfiziert, welches ein ecotropes Hüllprotein exprimiert. Die freigesetzten Retroviren wurden 36, 48, 60 und 72 h nach Transfektion mit dem Zellkulturüberstand geerntet und in murinen Fibroblasten (NIH 3T3) auf ihre Funktionsfähigkeit hin geprüft. Die viralen Titer der einzelnen Überstände wurden anhand ihrer GFP-Expression in NIH 3T3-Zellen durchflusscytometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 2.8.4).

3.3.2 Expression der M25-ATG2- und M25-ATG6-Proteine durch retrovirale Vektoren

Die retrovirale Expression der M25-ATG2- und M25-ATG6-Proteine wurde mit Hilfe von Immunoblots überprüft (siehe Kapitel 2.4). Die Größe der retroviral exprimierten Proteine wurde mit den M25-Proteinen verglichen, die bei einer MCMV-Infektion exprimiert werden. Zusätzlich wurde die Expression des Kontrollvektors pSF modb7-2 überprüft. Hierzu wurden MEF mit MCMV M25HA infiziert, sowie mit den Retroviren pSF M25-ATG2, pSF M25-ATG6 und pSF modb7-2 transduziert.

Die MCMV M25HA-infizierten Zellen wurden 24 h p.i. geerntet, die retroviral transduzierten Zellen 72 h nach Transduktion. Die Zelllysate wurden mit Hilfe von Immunoblots mit einem HA-spezifischen Antikörper analysiert. Die Menge der HA-markierten Proteine, die durch retrovirale Vektoren exprimiert wurden, war deutlich geringer als die der von MCMV M25HA exprimierten Proteine. Daher erfolgte für die Detektion der MCMV M25HA-Signale eine Exposition von 90 Sekunden, die retroviralen HA-Signale wurden dagegen erst nach 7,5 Minuten detektiert.

MCMV M25HA-infizierte Zellen exprimierten vier Proteinspezies, die von dem HA-Antikörper detektiert wurden. Neben den Banden mit 130 bzw. 105 kDa Molekulargewicht wurden Banden bei ca. 90 kDa sowie ca. 70 kDa detektiert (Abbildung 3.6, linke Spur). Mit pSF M25-ATG2 transduzierte Zellen exprimierten vornehmlich ein Protein mit einem Molekulargewicht von 130 kDa, in geringerer Menge ein Protein von ca. 90 kDa, sowie in sehr schwacher Ausprägung zwei weitere Proteine mit dem Molekulargewicht von ca. 70 und 65 kDa (Abbildung 3.6, 2. Spur). Die Proteine bei 130, 90 und 70 kDa entsprachen in ihren Größen den bei einer MCMV-Infektion exprimierten M25-Proteinen.

Die mit pSF M25-ATG6 transduzierten Zellen (Abbildung 3.6, 3. Spur) exprimierten zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von 105 und 90 kDa. Sehr schwach konnten ebenfalls zwei weitere Proteinbanden mit dem Molekulargewicht von ca. 70 und 65 kDa detektiert

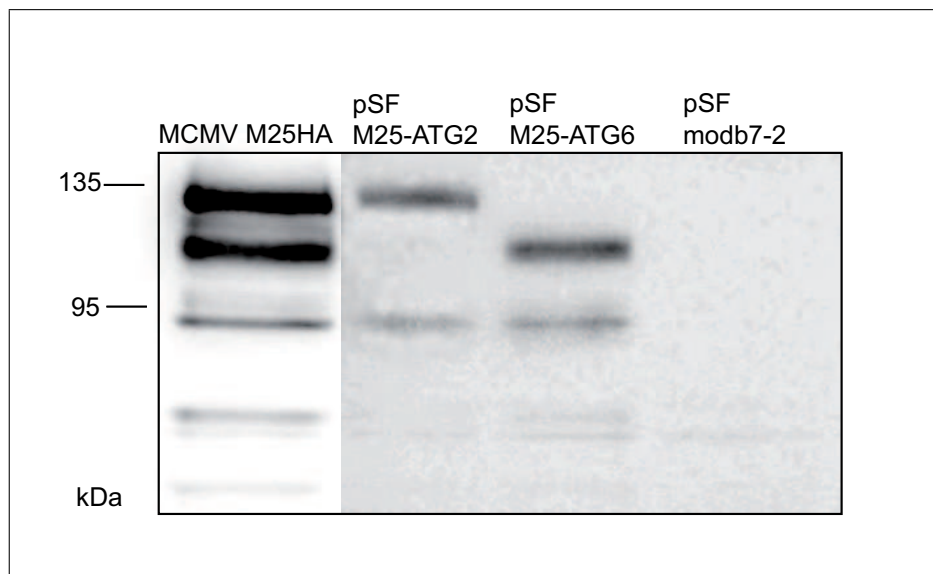


Abbildung 3.6 Expression von M25-Proteinen durch retrovirale Vektoren. MEF wurden mit MCMV M25HA infiziert, sowie mit den Retroviren pSF M25-ATG2, pSF M25-ATG6 und pSF modb7-2 transduziert. Die M25-Proteine wurden mit einem HA-spezifischen Antikörper detektiert. Die Positionen von Protein-Größenstandards sind an der linken Seite angegeben. Alle Lysate befanden sich auf der selben Membran. Die linke Spur zeigt MCMV M25HA-Signale nach 90 Sekunden Exposition, die drei rechten Spuren zeigen die detektierten Signale nach 7,5 Minuten Exposition im Phospho-Imager.

werden. Auch hier entsprachen die Größen der 105, 90 und 70 kDa Proteine den bei einer MCMV-Infektion exprimierten M25-Proteinen.

pSF modb7-2-transduzierte Zellen (Abbildung 3.6, rechts) exprimierten lediglich ein vom HA-Antikörper detektiertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa, welches sich ebenfalls in pSF M25-ATG2- und pSF M25-ATG6-transduzierten Zellen, nicht aber in MCMV-infizierten Zellen wiederfand. Hierbei handelte es sich vermutlich um ein unspezifisch detektiertes retrovirales Protein.

3.3.3 Subzelluläre Lokalisation der M25-Proteine bei MCMV-unabhängiger Expression

Versuche mit MCMV M25HA zeigten, dass sich M25-Proteine sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma infizierter Zellen befanden. Dabei konnte aber nicht auf die Lokalisation der einzelnen M25-Proteinspezies geschlossen werden (vgl. Kapitel 3.2.2).

Durch Expression von M25-ATG2 und M25-ATG6 mittels retroviraler Vektoren wurde die Lokalisierung dieser Proteine ohne den Kontext einer MCMV-Infektion untersucht. Der Nachweis dieser Proteine in bestimmten Kompartimenten der Zelle lässt gegebenenfalls Rückschlüsse auf die Funktionen dieser Proteine zu. Um dies zu untersuchen, wurden

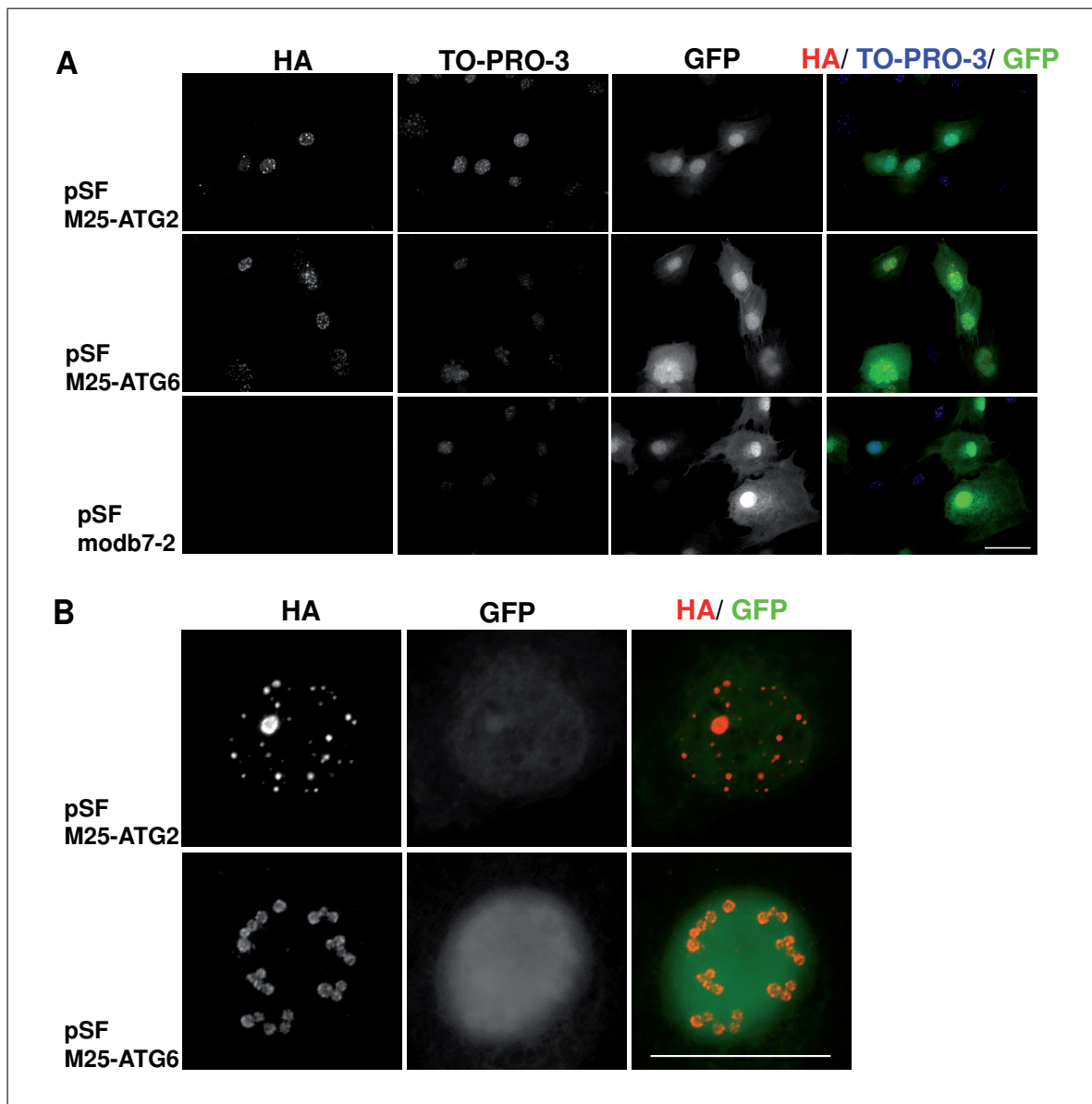


Abbildung 3.7 Subzelluläre Lokalisation der M25-ATG2- und M25-ATG6-Proteine. MEF wurden mit den Retroviren pSF M25-ATG2, pSF M25-ATG6 und pSF modb7-2 transduziert. 72 h nach Transduktion wurden die Zellen mit einem HA-spezifischen Antikörper gefärbt. Die Analyse erfolgte im Epifluoreszenzmikroskop.

(A) Überblick über die subzelluläre Lokalisation der Proteine. Die Zellkerne wurden mit TO-PRO-3 gefärbt. Retroviral transduzierte Zellen sind anhand ihrer GFP-Expression identifizierbar. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm . (B) Detaillierte Darstellung der Zellkerne M25-ATG2- und M25-ATG6-exprimierender Zellen. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

MEF mit den Retroviren pSF M25-ATG2, pSF M25-ATG6, sowie mit dem Kontrollvirus pSF modb7-2 transduziert (siehe Abschnitt 2.8.3). Die Analyse der Zellen erfolgte 72 h nach Transduktion im Epifluoreszenzmikroskop (siehe Kapitel 2.5). Dazu wurden die Zellen fixiert und das C-terminale HA-Epitop mit einem HA-spezifischen Antikörper detektiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurden die Zellen zusätzlich mit TO-PRO-3 gefärbt. Retroviral transduzierte Zellen wurden anhand ihrer GFP-Expression identifiziert. In modb7-2-exprimierenden Zellen war kein Antikörpersignal detektierbar. Dies belegt die Spezifität des Antikörpers (Abbildung 3.7 A, unten).

Sowohl M25-ATG2- als auch M25-ATG6-Proteine waren hauptsächlich im Zellkern detektierbar (Abbildung 3.7 A und B). Ein Großteil der Proteine wies eine punkt- bzw. kreisförmige Anordnung auf, ein Teil des Signals war jedoch auch diffus im Zellkern, sowie im Cytoplasma in der Umgebung des Nukleus zu erkennen. Unterschiede in der subzellulären Verteilung von M25-ATG2- und M25-ATG6-Proteine waren nicht feststellbar. Die von beiden M25-Proteinen gebildeten Strukturen lagen entweder punkt- oder ringförmig vor (Abbildung 3.7 B). Um ein genaueres Bild der von M25-Proteinen im Zellkern gebildeten Aggregate zu erhalten, wurde die Lokalisation der M25-ATG6-Proteine mit Hilfe konfokaler Mikroskopie untersucht. Hierzu wurden MEF wie oben beschrieben mit dem

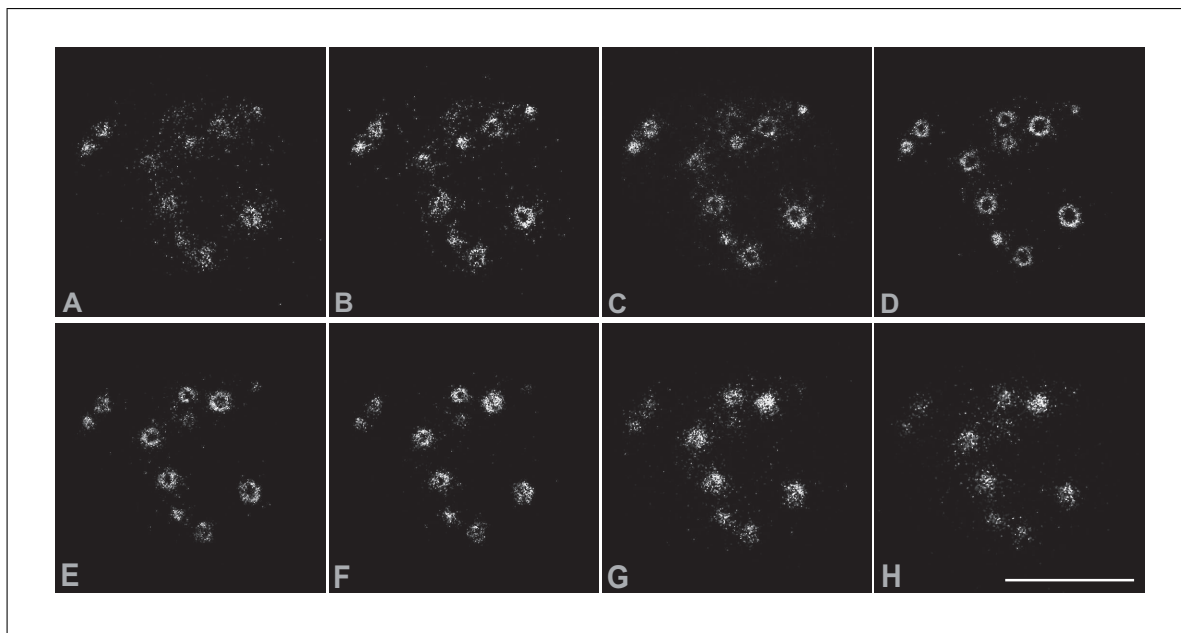


Abbildung 3.8 Morphologie der M25-ATG6-Aggregate im Zellkern. MEF wurden mit dem retroviralen Vektor pSF M25-ATG6 transduziert und 72 h nach Transduktion mit einem HA-spezifischen Antikörper gefärbt. Im konfokalen Laser-scanning-Mikroskop wurde eine Serie von Bildern entlang der Z-Achse aufgenommen (A-H). Gezeigt sind acht von insgesamt 18 Schnitten, die im Abstand von 160 nm von einem Zellkern angefertigt wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

retroviralen Vektor pSF M25-ATG6 transduziert und die HA-markierten Proteine mit einem spezifischen Antikörper gefärbt. In Abbildung 3.8 sind die M25-Aggregate eines Zellkerns gezeigt, die entlang der Z-Achse in Schnitten mit 160 nm Abstand aufgenommen wurden. Durch diese Betrachtung wird deutlich, dass die im Epifluoreszenzmikroskop detektierten punkt- und ringförmigen Strukturen unterschiedliche Ebenen der M25-Aggregate darstellen. In den Schnitten entlang der Z-Achse war eine kugelförmige Struktur der M25-Aggregate erkennbar, wobei im Inneren der Strukturen keine M25HA-Signale detektiert wurden.

3.4 Das potentielle Kernimportsignal der M25-Proteine

M25-Proteine wurden in MCMV-infizierten Zellen insbesondere zu frühen Zeitpunkten der Infektion im Zellkern detektiert. Einzelne Analysen der beiden M25-Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 zeigten, dass sich beide Proteine in den Zellkernen retroviral transduzierter Zellen befanden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die nukleäre Lokalisation der M25-Proteine genauer untersucht.

3.4.1 Identifizierung eines Kernimportsignals in der M25-Aminosäuresequenz

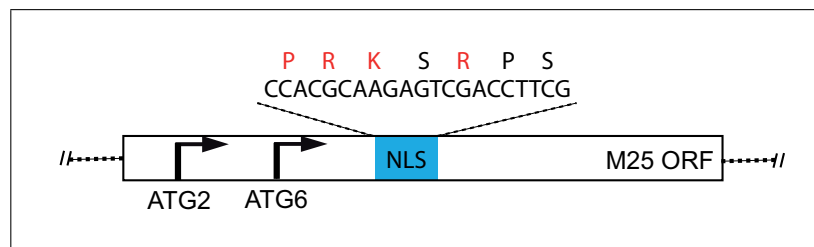


Abbildung 3.9 Lage eines potentiellen Kernimportsignals (NLS) in der M25-Aminosäuresequenz. Ein potentielles Kernimportsignal wurde in der M25-Aminosäuresequenz identifiziert. Gezeigt ist die schematische Darstellung des M25 ORFs, in das die Lage des Kernimportsignals eingezeichnet ist. Es ist sowohl die Nukleotidsequenz als auch die entsprechende Aminosäuresequenz des potentiellen Kernimportsignals dargestellt.

Generell ist eine nukleäre Lokalisation von Proteinen durch verschiedene Mechanismen möglich. M25-Proteine könnten über einen Kotransport mit anderen Proteinen in den Zellkern transportiert werden, welche über ein Kernimportsignal (NLS) verfügen. Andererseits könnte in der M25-Sequenz ein Aminosäuremotiv vorhanden sein, welches den direkten Transport in den Zellkern bewirkt.

Eine Analyse der M25-Aminosäuresequenz sollte klären, ob ein Kernimportsignal für die Lokalisation von M25-Proteinen im Zellkern verantwortlich war. Die Aminosäuresequenz des vollständigen M25-Proteins wurde mithilfe des Sequenz-Analyse-Programms PsortII (<http://www.psort.org/>) untersucht. Der Abgleich mit bekannten in der Datenbank gespeicherten Sequenzmotiven ermöglicht eine Vorhersage über die potentielle subzelluläre Lokalisation eines Proteins. Hierbei wurde ein sogenanntes „pat7“-Kernimportsignal in der M25-Sequenz identifiziert, welches sich aus den Aminosäuren PRKSRPS zusammensetzt (Abbildung 3.9). Gemäß Definition beinhaltet ein „pat7“-Kernimportsignal eine Abfolge von Aminosäuren, in der auf einen Prolin-Rest ein basisches Segment mit drei Lysin- oder Argininresten folgt. Im Anhang ist das Kernimportsignal in der M25-Aminosäuresequenz gekennzeichnet.

3.4.2 Mutation des Kernimportsignals im retroviralen Vektor pSF M25-ATG6

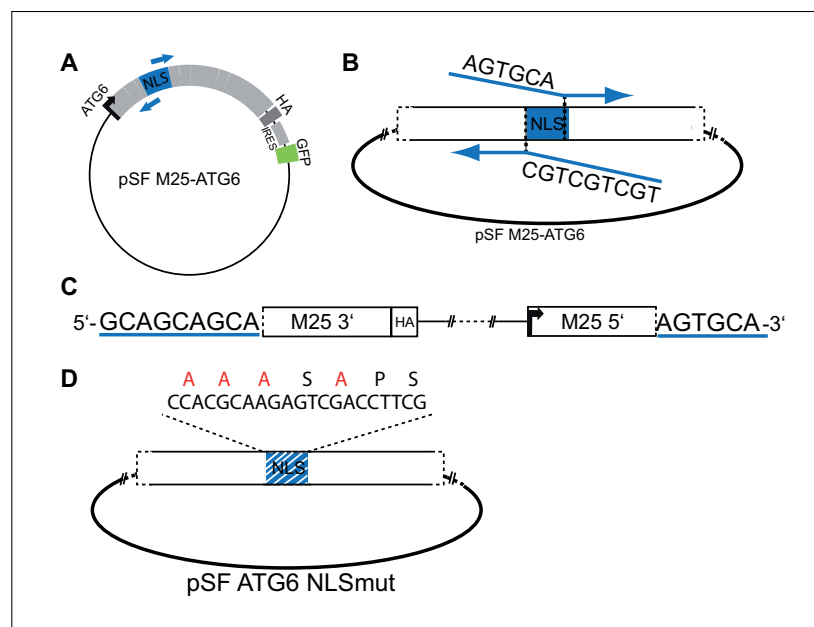


Abbildung 3.10 Strategie zur Herstellung des retroviralen Expressionsvektors pSF ATG6 NLSmut. Das potentielle Kernimportsignal wurde im retroviralen Expressionsvektor pSF M25-ATG6 mit Hilfe einer Quick Mutagenese PCR mutiert. (A) zeigt die Lage der zur Mutation verwendeten Primer in pSF M25-ATG6. (B) Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen im M25 ORF. Mit Hilfe der Primer wurde die Kernimportsignal-Sequenz modifiziert. (C) Nach der PCR trägt das linearisierte Plasmid die Sequenz für die Mutation des Kernimportsignals am 5'- und 3'-Ende. Durch Ligation entsteht das Plasmid pSF ATG6 NLSmut (D), in dem die Konsensusaminosäuren für das Kernimportsignal gegen Alanin-Reste ausgetauscht wurden.

Durch Mutation der basischen Aminosäuren innerhalb der Konsensussequenz des Kernimportsignals und anschließender Expression wurde überprüft, ob das identifizierte potentielle Kernimportsignal tatsächlich eine nukleäre Lokalisation der M25-Proteine verursacht. Da beide M25-Proteine eine nukleäre Lokalisation und eine ähnliche Verteilung innerhalb des Zellkerns zeigten, wurde die Funktionalität des Kernimportsignals anhand des Proteins M25-ATG6 untersucht.

Mit Hilfe einer Quick Mutagenese PCR (Abschnitt 2.3.11) wurden die drei basischen Aminosäuren des potentiellen Kernimportsignals, sowie der Prolinrest am Anfang des Motivs gegen Alanin-Reste ausgetauscht (Abbildung 3.10). Das durch die PCR entstandene linearisierte Plasmid (Abbildung 3.10 C) wurde durch Ligation zirkularisiert und in Bakterien amplifiziert. Die Integrität der Mutation des Kernimportsignals wurde durch Sequenzanalysen verifiziert. Unter Verwendung des Plasmids pSF ATG6 NLSmut (Abbildung 3.10 D) wurden, wie in Kapitel 2.8 beschrieben, Retroviren hergestellt.

3.4.3 Subzelluläre Lokalisation der M25-Proteine nach Mutation des Kernimportsignals

Zur Untersuchung der Funktionalität des Kernimportsignals wurde die subzelluläre Lokalisation der M25-ATG6-Proteine mit originärem und mutiertem Kernimportsignal miteinander verglichen. Hierfür wurden MEF mit den Retroviren pSF M25-ATG6 und pSF ATG6 NLSmut transduziert. Die Zellen wurden 72 h nach Transduktion fixiert und mit einem HA-spezifischen Antikörper gefärbt (siehe Kapitel 2.5). Die Lokalisation der M25-Proteine wurde anschließend im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Wie zuvor ließen sich M25-ATG6-Proteine als kreisförmige Strukturen in den Zellkernen der MEF detektieren (Abbildung 3.11 links). Dagegen waren M25-ATG6 NLSmut-Proteine größtenteils im Cytoplasma der MEF auffindbar (Abbildung 3.11 rechts). Im Zellkern waren nur sehr wenige M25-ATG6 NLSmut-Proteine zu beobachten. Im Cytoplasma ließen sich die M25-ATG6 NLSmut-Proteine zum Teil als kreisförmige Strukturen detektieren, ein Teil des HA-Signals lag in diffuser Verteilung in der gesamten Zelle vor.

Insgesamt schien die Gesamtmenge an exprimierten M25-ATG6 NLSmut-Proteinen höher als die an M25-ATG6-Proteinen zu sein. Zum einen waren wesentlich mehr der kreisförmigen Strukturen vorhanden, zum anderen war auch das diffuse M25-ATG6 NLSmut-Signal stärker ausgeprägt als in pSF M25-ATG6-transduzierten Zellen. Die hauptsächlich cytoplasmatische Lokalisation der M25-ATG6 NLSmut-Proteine weist darauf hin, dass das potentielle Kernimportsignal am Transport der M25-Proteine in den Zellkern beteiligt ist.

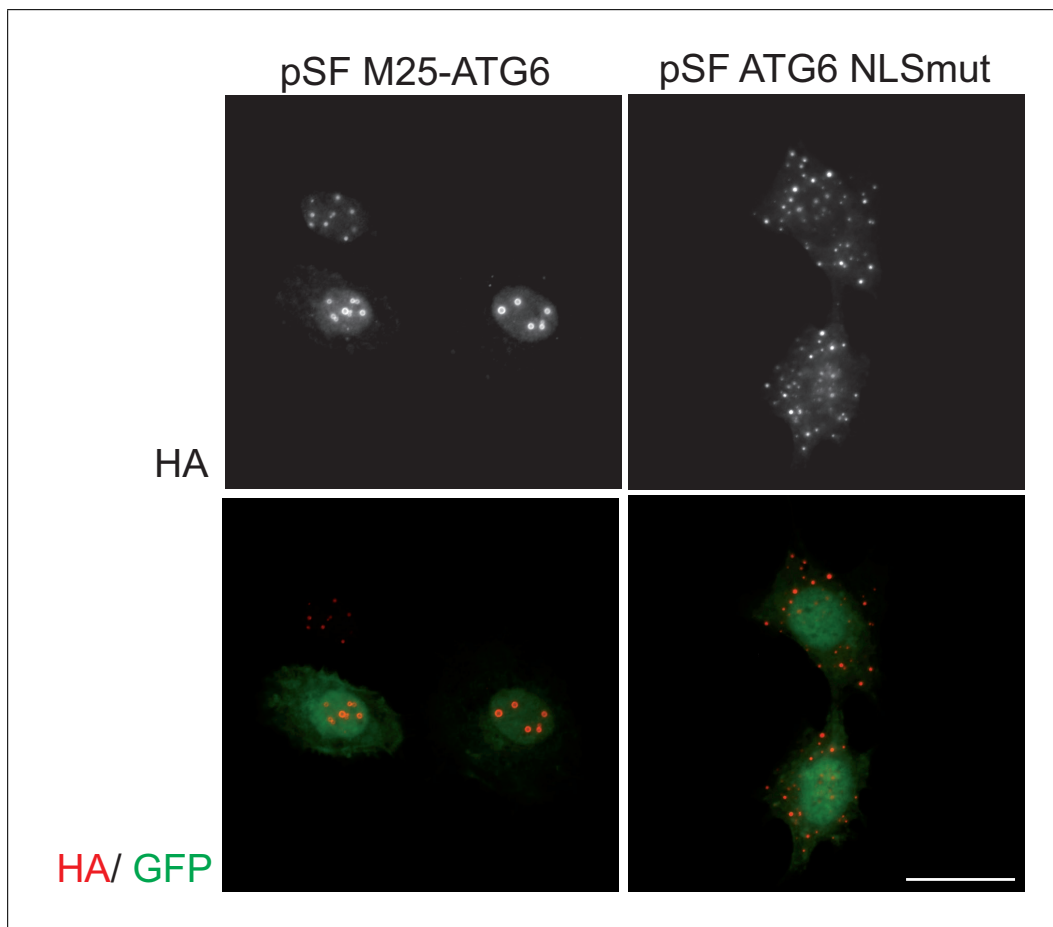


Abbildung 3.11 Subzelluläre Lokalisation von M25-ATG6-Proteinen nach Mutation des Kernimportsignals. MEF wurden mit den Retroviren pSF M25-ATG6 und pSF ATG6 NLSmut transduziert und die subzelluläre Lokalisation der M25-Proteine mit einem HA-spezifischen Antikörper detektiert. Die Analyse erfolgte im Epifluoreszenzmikroskop. Der Maßstabsbalken entspricht $20\mu\text{m}$.

3.5 Rolle des M25-Kernimportsignals in der MCMV-Infektion

Die Mutation des Kernimportsignals im retroviral exprimierten M25-ATG6-Protein zeigte, dass die nukleäre Lokalisation durch dieses Signal vermittelt wird. Daher sollte nun im MCMV-Genom durch Mutation des Kernimportsignals im M25 ORF der Einfluss des Signals auf sämtliche M25-Genprodukte während der viralen Infektion untersucht werden.

3.5.1 Mutation des Kernimportsignals im viralen M25 ORF

Für die Mutation des Kernimportsignals in MCMV wurde eine Flp-Rekombinase vermittelte Integration des mutierten M25 ORFs in das BAC MCMV-GFP $\Delta\text{M24-m25.2}$

durchgeführt (siehe Kapitel 2.7). Hierfür wurde das Plasmid pOri M25HA verwendet, welches den gesamten M25 ORF unter der Kontrolle des eigenen Promotorbereichs, sowie ein C-terminales HA-Epitop trägt (Kapitel 3.2.1).

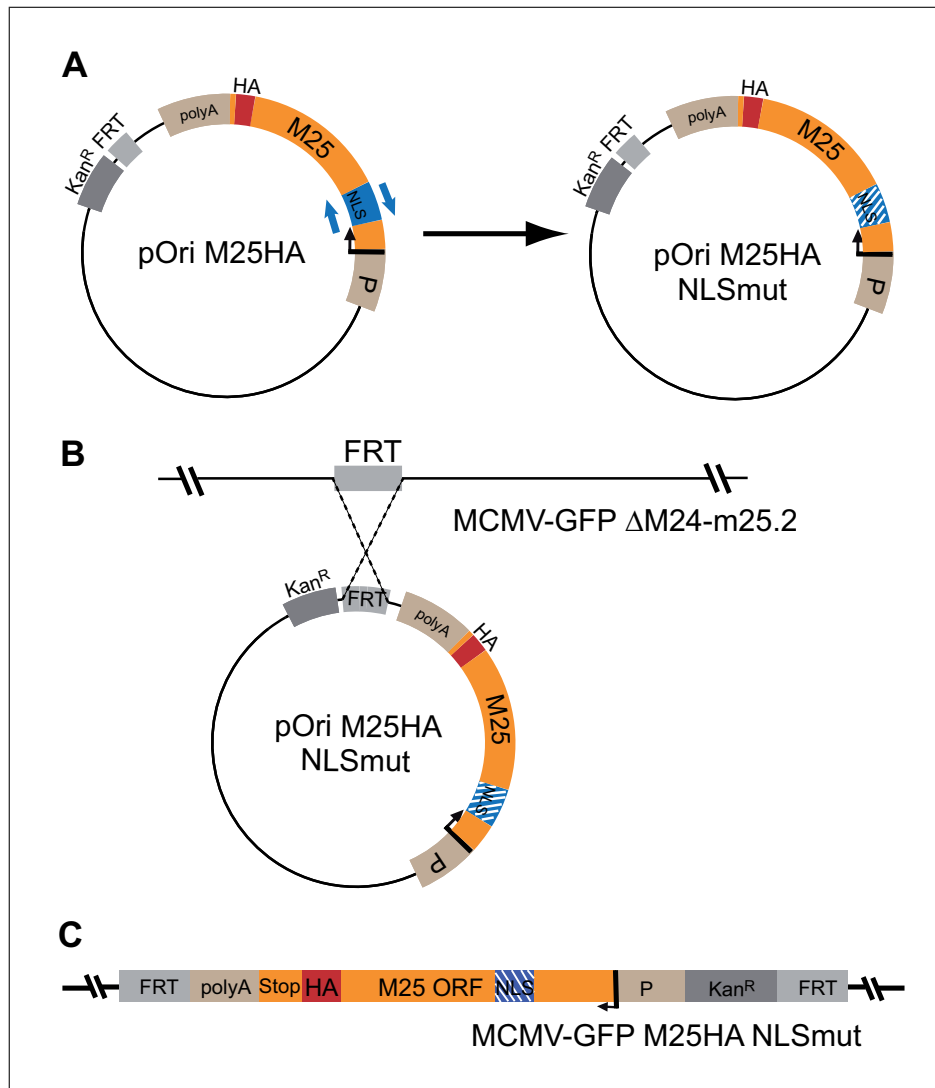


Abbildung 3.12 Mutation des M25-Kernimportsignals im MCMV-Genom. (A) Das Kernimportsignal wurde durch eine Quick Mutagenese PCR in pOri M25HA mutiert, es entstand pOri M25HA NLSmut. (B) Dieses Plasmid wurde über FLP-vermittelte Rekombination in das BAC MCMV-GFP ΔM24-m25.2 integriert. (C) Schematische Darstellung des resultierenden BACs MCMV-GFP M25HA NLSmut. Das Plasmid pOri M25HA NLSmut wurde vollständig in das Virusgenom integriert.

Mit einer Quick Mutagenese PCR (Abschnitt 2.3.11) wurden wiederum die drei basischen Aminosäuren des potentiellen Kernimportsignals, sowie der Prolinrest am Anfang des Motivs gegen Alaninreste ausgetauscht (Abbildung 3.12A). Das so entstandene Plasmid pOri M25HA NLSmut wurde durch Sequenzanalysen auf die Korrektheit der Mutation über-

prüft. Über eine bestehende FRT-Site wurde das Plasmid pOri M25HA NLSmut durch Flp-Rekombinase-vermittelte Rekombination in das BAC MCMV-GFP Δ M24-m25.2 integriert (Abbildung 3.12B, vgl. Abschnitt 3.2.1). Die Integrität des so entstandenen BAC MCMV-GFP M25HA NLSmut (Abbildung 3.12C) wurde durch Restriktionsanalysen verifiziert (Abschnitt 2.3.7). Die BAC-DNA wurde mit einem Transfektionsreagenz in MEF eingebracht (siehe Abschnitt 2.6.4). Die entstandenen Viruspartikel wurden mit dem Zellkulturüberstand geerntet und nach einer Sequenzanalyse zur Infektion weiterer Zellen verwendet. Durch Infektion einer großen Anzahl von MEF wurde ein Virus-Stock des MCMV-GFP M25HA NLSmut-Virus hergestellt (siehe Abschnitt 2.6.2).

3.5.2 Expression des M25 NLSmut-Proteins durch MCMV

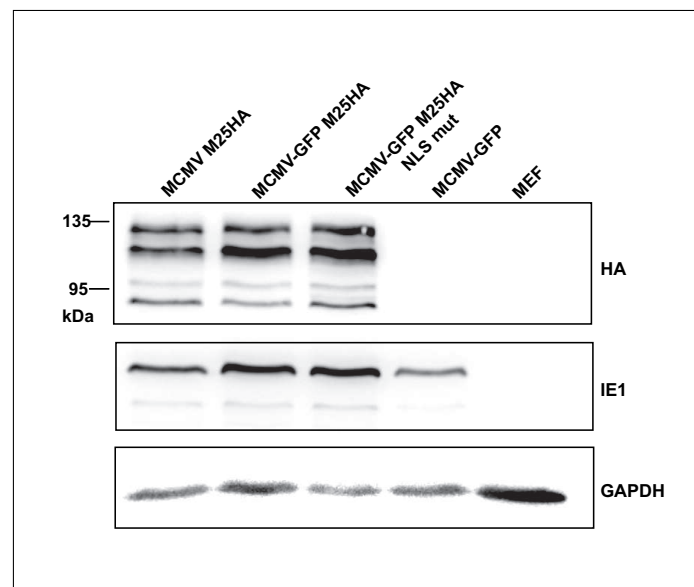


Abbildung 3.13 M25-Proteinexpression durch MCMV-GFP M25HA NLSmut. MEF wurden mit den MCMV Virus-Varianten MCMV M25HA, MCMV-GFP M25HA, MCMV-GFP M25HA NLSmut und MCMV-GFP infiziert. Die Zellen wurden 24 h p.i. geerntet, und die Expression der M25-Proteine wurde per Immunoblot mit einem HA-spezifischen Antikörper analysiert. Auf der rechten Spur wurde das Lysat nicht infizierter Zellen aufgetragen. Zusätzlich wurden die viralen IE1-Proteine, sowie das zelluläre Enzym GAPDH mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Positionen von Protein-Größenstandards sind an der linken Seite angegeben.

Mit der hergestellten Virusvariante MCMV-GFP M25HA NLSmut wurde überprüft, ob die Mutation des Kernimportsignals im M25 ORF eine veränderte M25-Proteinexpression zur Folge hat. Zudem sollte sichergestellt werden, dass durch die Insertion des M25 ORFs in die MCMV-GFP Δ M24-m25.2 Mutante keine grundsätzliche Veränderung in der Expression der verschiedenen M25-Proteine verursacht wurde.

Hierfür wurde die Expression von M25-Proteinen nach Infektion von MEF mit den Virusvarianten MCMV-GFP, MCMV M25HA, MCMV-GFP M25HA und MCMV-GFP M25HA NLSmut in einem Immuno-Blot analysiert (siehe Kapitel 2.4). 24 h p.i. wurden infizierte und nicht infizierte MEF geerntet und lysiert. Neben den verschiedenen M25HA-Proteinen wurde auch die Expression des IE1-Proteins analysiert, um die Expression eines M25-unabhängigen MCMV-Proteins zu überprüfen. Abschließend wurde die geladene Proteinmenge mit einem GAPDH-spezifischer Antikörper kontrolliert. Durch Verwendung des MCMV-GFP-Virus, welches kein HA-markiertes M25-Protein enthält, wurde die Spezifität des HA-Antikörpers gezeigt.

In MCMV M25HA- und MCMV-GFP M25HA-infizierten MEF waren identische Bandenmuster detektierbar (Abbildung 3.13). Die Proteinbanden bei ca. 130 kDa und ca. 105 kDa, welche den M25-Proteinen M25-ATG2 und M25-ATG6 entsprechen, waren am stärksten ausgeprägt. Weiterhin wurde bei beiden Virusvarianten eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa sowie eine sehr schwache Bande bei ca. 97 kDa detektiert. MCMV-GFP M25HA NLSmut-infizierte Zellen exprimierten identische M25-Proteinspezies. Demnach wurde die Expression der verschiedenen M25-Proteine durch die Mutation des Kernimportsignals nicht beeinflusst. Auch die IE1-Expression war in allen Virusvarianten vergleichbar.

3.5.3 Lokalisation des MCMV M25HA NLSmut-Proteins

Eine wesentliche Frage war, ob die Mutation des Kernimportsignals auch in MCMV-infizierten Zellen eine cytoplasmatische Lokalisation der M25-Proteine bewirkte. Denkbar wäre z.B., dass die Funktionalität des Kernimportsignals nur für die nukleäre Lokalisation eines M25-Proteins essentiell ist und andere M25-Proteine auch ohne funktionelles Kernimportsignal in den Kern transportiert würden, z.B. durch Kotransport mit anderen viralen oder zellulären Proteinen.

Zuvor war der Einfluss des Kernimportsignals auf die subzelluläre Lokalisation nur anhand des retroviral exprimierten M25-ATG6-Proteins untersucht worden. Aus diesem Grund wurden MEF mit MCMV-GFP M25HA NLSmut infiziert. Die Zellen wurden 5, 10 und 24 h p.i. fixiert, mit einem HA-spezifischen Antikörper gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert (siehe Kapitel 2.5). Neben den HA-spezifischen Signalen wurde die GFP-Expression der infizierten Zellen dokumentiert.

5 h p.i. waren HA-Signale im gesamten Cytoplasma infizierter Zellen zu detektieren (Abbildung 3.14). Es waren sowohl punktförmige Strukturen als auch eine diffuse Verteilung der HA-markierten Proteine zu erkennen. Im Bereich des Zellkerns konnte eine ähnliche Verteilung von M25HA NLSmut-Proteinen beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt war in MCMV-GFP M25HA-infizierten MEF kein großer Anteil an M25-Proteinen im Cyto-

plasma vorhanden (vgl. Abbildung 3.4). Auch schien die Gesamtmenge an detektierten M25-Signalen in MCMV-GFP M25HA NLSmut-infizierten MEF zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu MCMV-GFP M25HA-infizierten MEF wesentlich höher zu sein, was auch bei der retroviralen Expression von M25-ATG6 NLSmut der Fall war (vgl. Abbildung 3.11). 10 h p.i. war immer noch ein großer Anteil der M25HA NLSmut-Proteine im Cytoplasma lokalisiert, wobei diese zum Teil als kreisförmige Strukturen, zum Teil auch diffus verteilt vorlagen. In weiten Bereichen des Zellkerns waren hingegen keine M25HA NLSmut-Proteine mehr zu beobachten. Lediglich einzelne kreisförmige M25HA NLSmut-Aggregate waren im Bereich des Zellkerns detektierbar. Insbesondere die diffuse Verteilung des M25HA NLSmut-Signals beschränkte sich ausschließlich auf das Cytoplasma infizierter Zellen.

24 h p.i. waren weiterhin große Teile des Zellkerns frei von M25-Signalen, das diffuse M25-Signal beschränkte sich größtenteils auf das Cytoplasma. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der retroviralen Transduktion (vgl. Abschnitt 3.4.3) scheint daher das Kernimportsignal für die nukleäre Lokalisation sämtlicher Genprodukte des M25 ORFs verantwortlich zu sein.

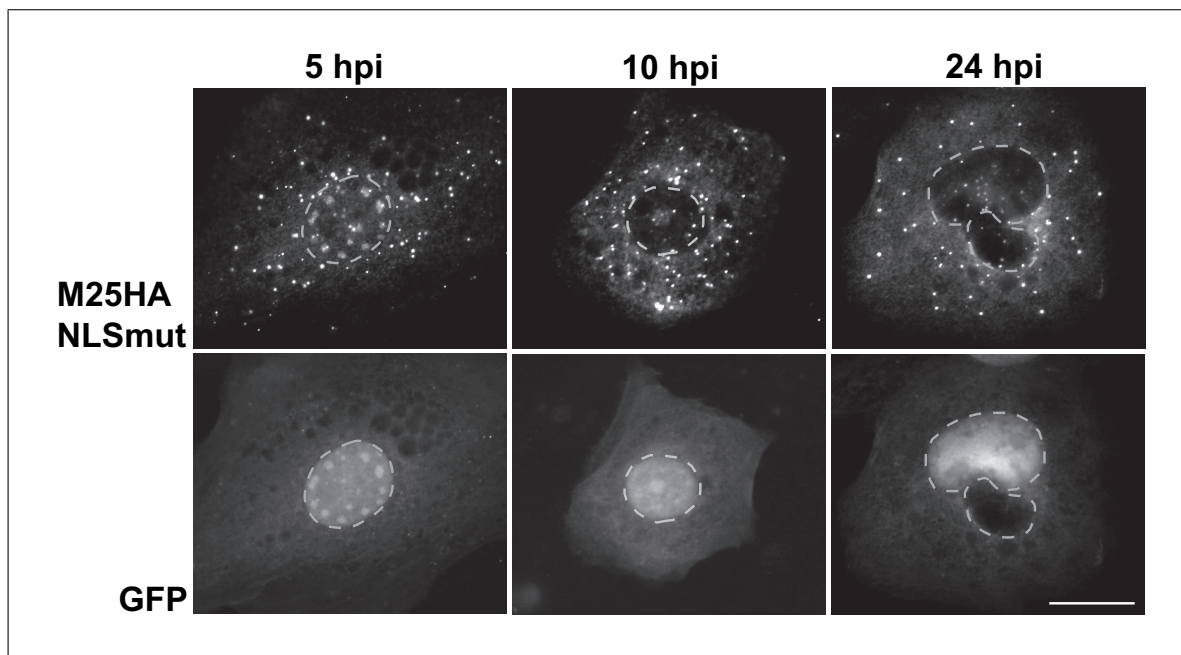


Abbildung 3.14 Subzelluläre Lokalisation der M25HA NLSmut-Proteine im Verlauf der MCMV-Infektion. MEF wurden mit MCMV-GFP M25HA NLSmut infiziert und die subzelluläre Lokalisation der M25HA NLSmut-Proteine 5, 10 und 24 h p.i. analysiert. Infizierte Zellen wurden anhand ihrer GFP-Expression identifiziert. Die HA-markierten M25HA NLSmut-Proteine wurden mit einem spezifischen HA-Antikörper detektiert. Die Analyse erfolgte im Epifluoreszenzmikroskop. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

3.6 Veränderung der Morphologie muriner Zellen durch M25-Proteine

Der Einfluss von M25-Proteinen auf die Morphologie infizierter Zellen konnte bereits durch Versuche mit MCMV-Deletionsmutanten demonstriert werden (siehe Abschnitt 1.3). Es blieb aber unklar, ob weitere virale Faktoren zur Abrundung der Zellen nötig sind. Außerdem war nicht bekannt, welches der verschiedenen M25-Proteine für die Veränderung von infizierten Zellen verantwortlich ist. Aus diesem Grund sollte die Morphologie von murinen Fibroblasten nach Transduktion mit M25-exprimierenden Retroviren untersucht werden. Hierzu wurden die zwei größten M25-Proteinspezies, M25-ATG2 und M25-ATG6, exprimiert.

3.6.1 Einfluss der M25-ATG2- und M25-ATG6-Proteine auf die Morphologie muriner Fibroblasten

Zur Durchführung dieses Versuchs wurden MEF mit 10 *infectious units* (IU)/ Zelle mit den Retroviren pSF M25-ATG2, pSF M25-ATG6, pSF modb7-2 und pSF β 91-eGFP transduziert (siehe Abschnitt 2.8.3). Die Zellen wurden nach 72 h fixiert, und das Aktin-Cytoskelett mit Phalloidin-TRITC gefärbt. Durch die Kopplung des Rhodamin-Farbstoffs TRITC an Phalloidin war eine Anfärbung der stabilisierten Aktinfilamente bei gleichzeitiger Detektion der GFP-Expression transduzierter MEF möglich. Die gefärbten Zellpräparate wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert und fotografiert. Mit Hilfe der Zeiss AxioVision Software wurde die maximale Länge GFP-exprimierender Zellen als Parameter der induzierten morphologischen Veränderungen vermessen (siehe Abschnitt 2.5.2).

In Abbildung 3.15A sind MEF dargestellt, die mit pSF M25-ATG2, pSF M25-ATG6 oder pSF modb7-2 transduziert worden waren. Die Zellen, die M25-ATG2 und M25-ATG6 exprimierten, zeigten einen wesentlich kleineren Durchmesser als die Kontrollzellen, die entweder modb7-2 oder nur GFP exprimierten. Während der Median der Zelllängen von pSF M25-ATG2-transduzierten Zellen 59,3 μm betrug, lag er bei pSF M25-ATG6-transduzierten Zellen bei 35,7 μm (Abbildung 3.15B). Die Länge pSF M25-ATG6-transduzierter Zellen war somit noch etwas geringer als die pSF M25-ATG2-transduzierter Zellen. Der Median der Zelllängen pSF modb7-2-transduzierter MEF betrug dagegen 84,7 μm und der pSF β 91-eGFP-transduzierter Zellen 94,4 μm . Die Längen der Zellen, die mit Kontrollviren transduziert worden waren, lagen in der Größenordnung nicht transduzierter MEF (Median 91 μm , Daten nicht gezeigt).

Es ist daher auszuschließen, dass retrovirale Proteine eine Zellabrundung und Verkleinerung der transduzierten MEF auslösen. Die Zellverkleinerung wurde ausschließlich durch

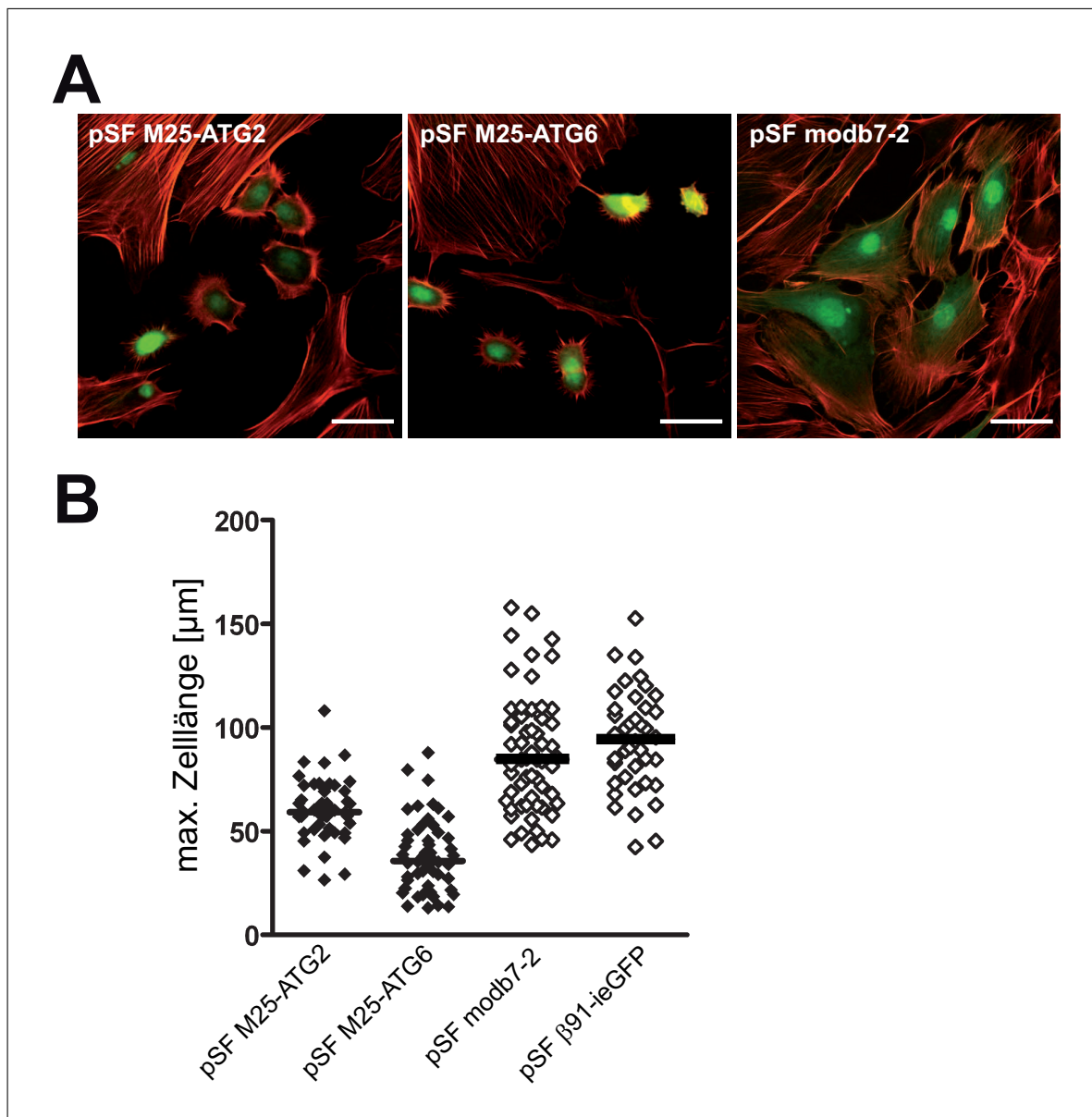


Abbildung 3.15 Veränderung der Größe M25-exprimierender Zellen. MEF wurden mit den Retroviren pSF M25-ATG2, pSF M25-ATG6, pSF modb7-2 und pSF β 91-eGFP transduziert. (A) Die Aktinfilamente wurden mit Phalloidin-TRITC angefärbt und transduzierte Zellen wurden anhand ihrer GFP-Expression identifiziert. Beispielsweise sind hier Zellen gezeigt, die mit pSF M25-ATG2, pSF M25-ATG6 und pSF modb7-2 transduziert wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm . (B) Zur Quantifizierung der durch M25-Expression ausgelösten Veränderungen in der Zellmorphologie wurden die maximalen Zelllängen retroviral transduzierter Zellen mit Hilfe der Zeiss AxioVision Software bestimmt. Die Mediane der maximalen Zelllängen sind als schwarze Linien im Diagramm dargestellt.

die Anwesenheit der M25-Proteine induziert. Anders als in MCMV-infizierten Zellen kam es jedoch nicht zu einer vollständigen Abrundung der retroviral transduzierten Zellen. Obgleich die Verkleinerung der Zellen deutlich erkennbar war, blieben die Fokalkontakte in den transduzierten Zellen erhalten (vgl. Abb. 3.18 und Abb. 3.15A). Auch zu späteren Zeitpunkten nach Transduktion (96 h) änderte sich dieser Zustand nicht. Der Einfluss der M25-Proteine auf die Fokalkontakte transduzierter Zellen wurde daher gesondert untersucht (vgl. Abschnitt 3.7.2).

3.6.2 Einfluss der Mutation des M25-Kernimportsignals auf die Morphologie transduzierter Fibroblasten

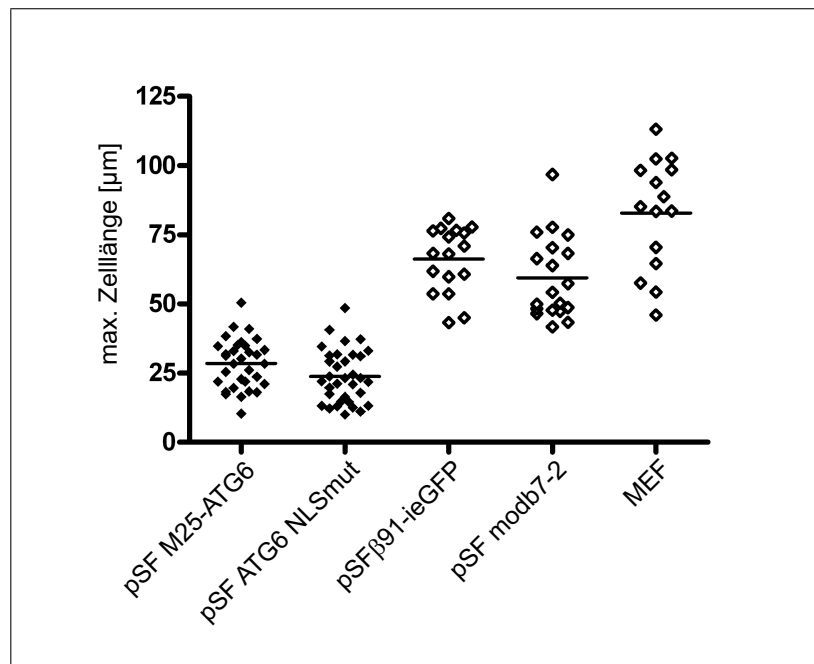


Abbildung 3.16 Einfluss der Mutation des Kernimportsignals im M25-ATG6 ORF auf die Zellmorphologie. MEF wurden mit den Retroviren pSF M25-ATG6, pSF ATG6 NLSmut, pSF modb7-2 und pSF β91-eGFP transduziert. Die Aktinfilamente wurden mit Phalloidin-TRITC angefärbt und die maximalen Zelllängen transduzierter Zellen mit Hilfe der Zeiss AxioVision Software bestimmt. Zusätzlich wurden die Längen nicht transduzierter Zellen gemessen. Die Mediane der Zelllängen sind als schwarze Linien im Diagramm dargestellt.

Die Funktionalität des Kernimportsignals in der M25-Aminosäuresequenz wurde in vorhergehenden Versuchen bestätigt (vgl. 3.4.3). Mit Hilfe des Retrovirus pSF ATG6 NLSmut sollte nun überprüft werden, ob die nukleäre Lokalisation von M25-Proteinen für Veränderungen in der Zellmorphologie notwendig ist. Zur Vermessung der Zelllängen wurden MEF

mit den Retroviren pSF M25-ATG6 und pSF ATG6 NLSmut, sowie mit den Kontrollviren pSF modb7-2 und pSF β 91-eGFP transduziert (siehe Abschnitt 2.8.3). Transduzierte sowie nicht transduzierte MEF wurden 72 h nach Transduktion fixiert und das Aktincytoskelett mit Phalloidin-TRITC gefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop wurden zufällig ausgewählte Bereiche aller Präparate fotografiert und die maximalen Längen der fotografierten Zellen unter Verwendung der Zeiss AxioVision Software bestimmt (siehe Abschnitt 2.5.2). Wie schon zuvor in Abschnitt 3.6 gezeigt, wiesen Zellen, die mit den Kontrollretroviren pSF modb7-2 und pSF β 91-eGFP transduziert wurden, ähnliche Zelllängen wie nicht transduzierte MEF auf. Dagegen zeigten pSF M25-ATG6-transduzierte MEF mit einem Median von 29,3 μ m deutlich geringere Zelllängen. Auch pSF ATG6 NLSmut-transduzierte MEF zeigten deutlich kleinere maximale Zelllängen, hier lagen diese mit einem Median von 22,7 μ m sogar unter denen von M25-ATG6-exprimierenden Zellen (Abbildung 3.16). Die hauptsächlich nukleäre Lokalisation der M25-Proteine ist daher nicht für die Induktion der Zellverkleinerung essentiell. Die Mutation des Kernimportsignals im retroviralen Vektor pSF M25-ATG6 sowie die Vermessung der Zelllängen nach Transduktion mit pSF ATG6 NLSmut wurde von Hazel Fuchs im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.

3.6.3 Morphologie muriner Fibroblasten nach Mutation des Kernimportsignals im viralen M25 ORF

In pSF ATG6 NLSmut-transduzierten MEF war eine ebenso starke Zellabrundung wie in pSF M25-ATG6-transduzierten MEF zu beobachten (vgl. Abschnitt 3.6.2). Die durch das M25-ATG6-Protein verursachten morphologischen Veränderungen wurden dabei nicht durch die Lokalisation des Proteins im Zellkern verursacht, da sich ein Großteil der M25-ATG6-Proteine im Cytoplasma der transduzierten Zellen befand. Die Frage, ob die subzelluläre und insbesondere die nukleäre Lokalisation von M25-Proteinen für die Induktion der Zellabrundung von Bedeutung ist, wurde nun vor dem Hintergrund einer MCMV-Infektion untersucht. Vorherige Versuche zeigten, dass die Mutation des Kernimportsignals im viralen M25 ORF die nukleäre Lokalisation sämtlicher M25-Genprodukte verhindert (vgl. Abschnitt 3.5.3).

Zur Untersuchung der Zellabrundung in MCMV-infizierten Zellen wurden MEF mit einer MOI von 3 mit MCMV-GFP und MCMV-GFP M25HA NLSmut infiziert. Die Zellen wurden nach 5, 10 und 24 h fixiert und das Aktin-Cytoskelett mit Phalloidin-TRITC angefärbt (siehe Kapitel 2.5). Die Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert, wobei infizierte Zellen anhand ihrer GFP-Expression identifiziert wurden. MCMV-GFP-infizierte MEF begannen sich 5 h p.i. abzurunden und lagen 24 h p.i. vollständig abge-

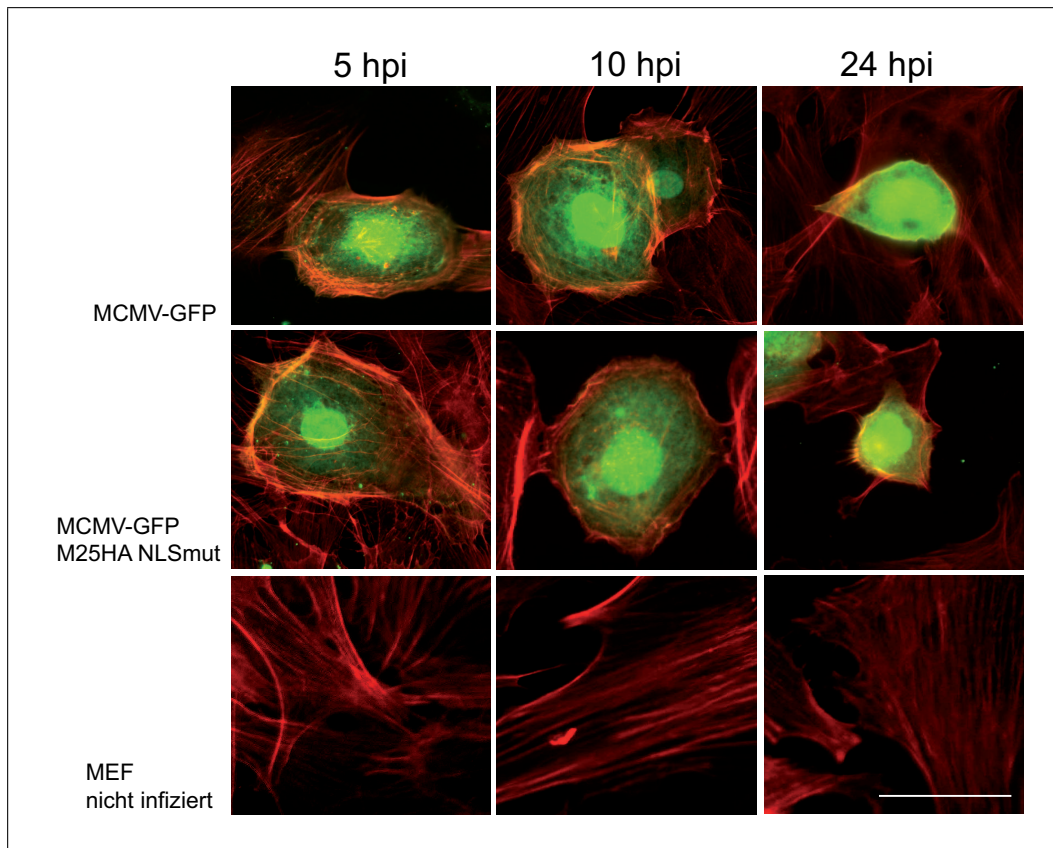


Abbildung 3.17 Zellabrundung nach Infektion mit MCMV-GFP M25HA NLSmut. MEF wurden mit MCMV-GFP oder mit MCMV-GFP M25HA NLSmut mit einer MOI von 3 infiziert. 5, 10 und 24 h p.i. wurden die zellulären Aktinfilamente mit Phalloidin-TRITC angefärbt. MCMV-infizierte Zellen wurden anhand ihrer GFP-Expression identifiziert. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

rundet vor (Abbildung 3.17). Die Infektion mit MCMV-GFP M25HA NLSmut induzierte eine gleichartige Veränderung der Zellmorphologie wie eine Infektion mit MCMV-GFP und führte 24 h p.i. zur gänzlichen Abrundung der infizierten Zellen. Die nukleäre Lokalisation der M25-Proteine ist demnach bei einer MCMV-Infektion nicht zur Induktion der Zellabrundung erforderlich.

3.7 Expression des Fokalkontakt-Proteins Paxillin in infizierten und transduzierten Zellen

Zelluläre Fokalkontakte sind wesentlich an den Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts beteiligt. Ein zentrales Protein hierfür ist Paxillin, welches bei der Organisation der Fokalkontakte und bei der Signalvermittlung durch diese Proteinkomplexe wichtige Funktionen ausübt (siehe Abschnitt 1.2.2). Die Veränderungen der Fokalkontakte im Verlauf einer

MCMV-Infektion sowie nach retroviraler Expression von M25-Proteinen sollten anhand der subzellulären Lokalisation der Paxillin-Proteine untersucht werden.

3.7.1 Fokalkontakte in MCMV-infizierten Zellen

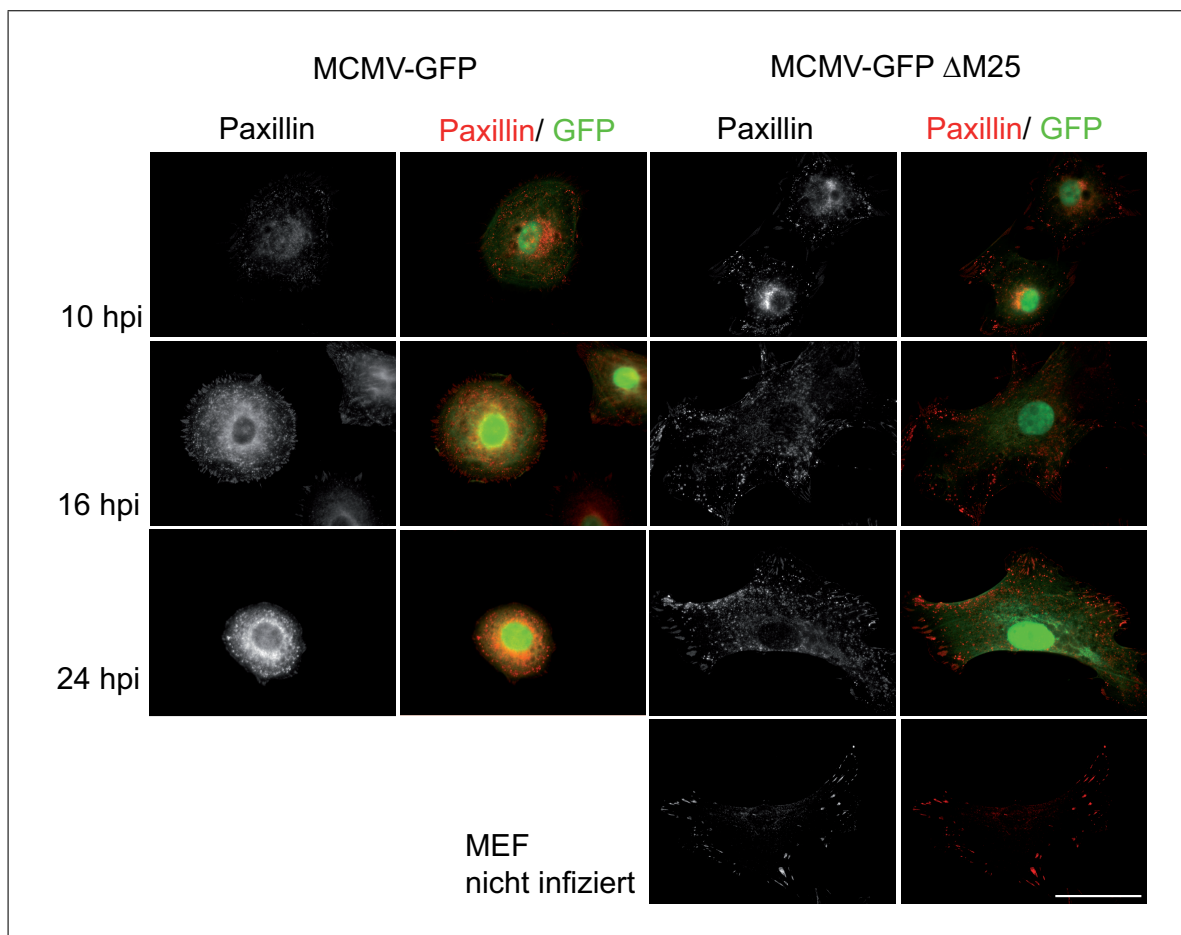


Abbildung 3.18 Darstellung der Fokalkontakte MCMV-infizierter Zellen anhand von Paxillin. MEF wurden mit MCMV-GFP oder mit MCMV-GFP Δ M25 infiziert und 10, 16 und 24 h p.i. fixiert. Das Fokalkontakt-assoziierte Protein Paxillin wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Zusätzlich wurden nicht infizierte Zellen analysiert (unten rechts). Die Analyse erfolgte im Epifluoreszenzmikroskop. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

Um zu untersuchen, wie sich eine MCMV-Infektion auf die Fokalkontakte muriner Zellen auswirkt, wurden MEF mit MCMV-GFP oder MCMV-GFP Δ M25 infiziert. Hiermit sollte geklärt werden, ob die Abwesenheit von M25-Genprodukten eine Veränderung von Fokalkontakten verhindert und somit M25-Genprodukte einen direkten oder indirekten Einfluss auf Fokalkontakte ausüben. Die Fokalkontakte wurden hierbei durch das Fokalkontakt-assoziierte Protein Paxillin dargestellt.

10, 16 und 24 h p.i. wurden die Zellen mit Paxillin-spezifischen Antikörpern markiert, um die Veränderungen in den Fokalkontakten während des Verlaufs der Infektion im Fluoreszenzmikroskop zu analysieren (siehe Kapitel 2.5). Infizierte Zellen wurden anhand ihrer GFP-Expression identifiziert.

10 h p.i. ließ sich in MCMV-GFP-infizierten Zellen eine Abrundung beobachten (Abbildung 3.18, links). 16 h p.i. waren die Zellen vollständig abgerundet und 24 h p.i. war eine deutliche Verkleinerung der infizierten Zellen zu erkennen. Wie in nicht infizierten Zellen (Abbildung 3.18, unten rechts) war 10 h p.i. das Paxillin in Fokalkontakten lokalisiert, welche an den Ausläufern solcher Zellen gut zu erkennen waren. Zudem war in den MCMV-GFP-infizierten Zellen jedoch eine diffuse Verteilung von Paxillin in der Umgebung des Zellkerns im Cytoplasma erkennbar. Insbesondere war hier eine Akkumulation des Paxillins an einer Seite des Zellkerns zu beobachten. Auch 16 h p.i. war Paxillin noch in den Fokalkontakten präsent, die sich nun in den Randbereichen der jetzt abgerundeten Zellen befanden. Weiterhin fand sich ein diffuses Paxillin-Signal innerhalb des Cytoplasmas, welches sich im direkten Umkreis des Zellkerns verdichtete. 24 h p.i. waren nur noch wenige Fokalkontakte vorhanden. Das Paxillin-Signal verdichtete sich weiter um den Zellkern herum, während in der Peripherie eher kreisförmige Paxillin-Strukturen vorhanden waren.

MCMV-GFP Δ M25-infizierte Zellen zeigten keine morphologische Veränderung im Verlauf der Infektion (Abbildung 3.18, rechts). Die Zellen blieben auch 24 h p.i. ausgestreckt und zeigten vergleichbare Größen wie nicht infizierte Zellen (Abbildung 3.18, unten). 10 h p.i. war das Paxillin in den Fokalkontakten gut detektierbar. Eine diffuse Verteilung des Proteins war nicht festzustellen, allerdings waren punktförmige Paxillin-Signale im Cytoplasma zu erkennen. Wie bei MCMV-GFP-infizierten Zellen war eine Akkumulation von Paxillin an einer Seite des Zellkerns sichtbar. 16 h p.i. war weiterhin Paxillin als Komponente der Fokalkontakte deutlich ausgeprägt. Im Cytoplasma waren jedoch ebenfalls punktförmige Paxillin-Strukturen vorhanden. Im Gegensatz zur Position des Proteins in MCMV-GFP-infizierten Zellen war jedoch keine Verdichtung des Proteins um den Zellkern zu erkennen, die Paxillin-Strukturen waren eher in der Zellperipherie lokalisiert. 24 h p.i. waren sehr ausgeprägte Fokalkontakte vorhanden. Die Verteilung der cytoplasmatischen Paxillin-Strukturen glich der Verteilung 16 h p.i.

Obwohl die Gesamtmorphologie der MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen der nicht infizierter Zellen glich, war in den MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen der Anteil cytoplasmatischen Paxillins erhöht, insbesondere die detektierten punktförmigen Strukturen des Proteins waren in nicht infizierten Zellen nicht so ausgeprägt wie in MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen.

3.7.2 Fokalkontakte in M25-exprimierenden Zellen

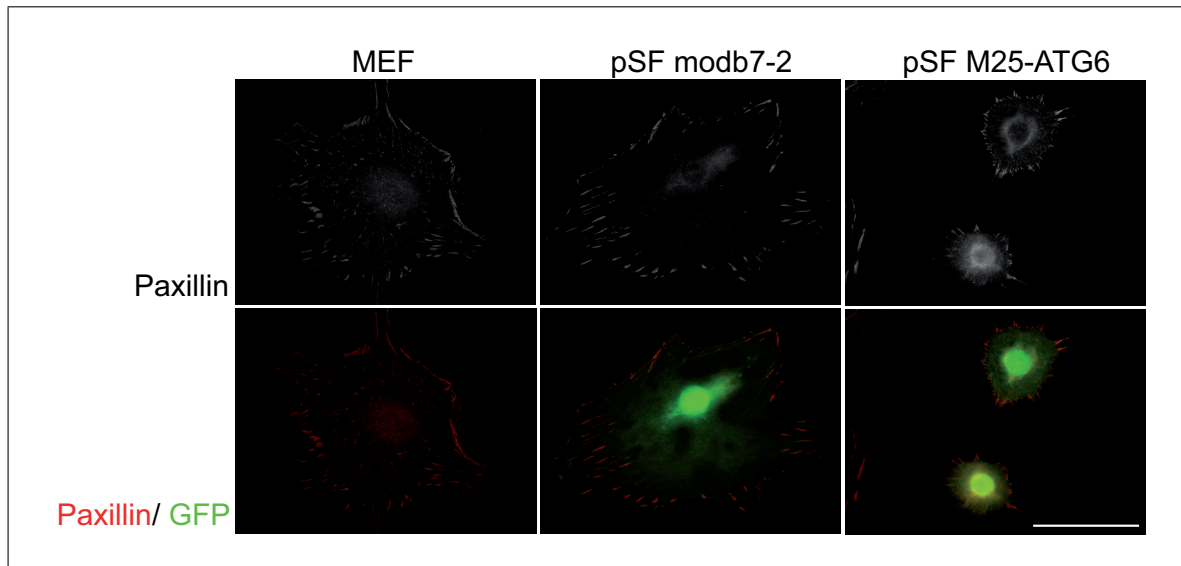


Abbildung 3.19 Lokalisation des Fokalkontakt-assoziierten Proteins Paxillin in retroviral transduzierten Zellen. MEF wurden mit den Retroviren pSF modb7-2 und pSF M25-ATG6 transduziert. Die Ausbildung von Fokalkontakten wurde anhand der subzellulären Lokalisation von Paxillin beobachtet. Parallel dazu wurde Paxillin in nicht transduzierten Zellen angefärbt. Die Analyse erfolgte im Epifluoreszenzmikroskop. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

In MCMV-infizierten Zellen wurden die Fokalkontakte im Verlauf der Infektion abgebaut und das Protein Paxillin verteilte sich im Cytoplasma infizierter Zellen, wobei es sich besonders um den Zellkern herum verdichtete. Nach Infektion mit einer M25-Deletionsmutante blieben die Fokalkontakte erhalten und die Zellen behielten ihre ausgestreckte Form bei (vgl. Abschnitt 3.7.1).

Es wurde nun untersucht, ob die alleinige Expression von M25-ATG6 durch retrovirale Vektoren die Verteilung von Paxillin in MEF beeinflusst. MEF wurden mit pSF M25-ATG6 und mit pSF modb7-2 als Kontroll-Virus transduziert. 72 h nach Transduktion wurden transduzierte sowie nicht transduzierte MEF mit Paxillin-spezifischen Antikörpern gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (siehe Kapitel 2.5). Retroviral transduzierte Zellen wurden anhand ihrer GFP-Expression identifiziert.

Bei pSF modb7-2-transduzierten und nicht transduzierten MEF war eine deutlich ausgestreckte Form der Zellen zu beobachten und die Zellen zeigten eine Konzentration von Paxillin an den zahlreich vorhandenen Fokalkontakten (Abbildung 3.19). Es ist daher auszuschließen, dass ein etwaiger Abbau oder die Veränderung von Fokalkontakten auf die retrovirale Transduktion der MEF zurückzuführen ist. pSF M25-ATG6-transduzierte Zellen zeigten dagegen deutliche morphologische Veränderungen. Sie waren erheblich klei-

ner als die Kontrollzellen und wiesen einen abgerundeten Phänotyp auf. Es war eine diffuse Verteilung des Paxillins im Cytoplasma zu beobachten. Trotz der deutlichen Verkleinerung der Zellen waren jedoch noch Fokalkontakte vorhanden, in denen Paxillin-Proteine konzentriert vorlagen. Es kam also in den M25-exprimierenden retroviral transduzierten Zellen, im Gegensatz zu MCMV-infizierten Zellen, nicht zu einem vollständigen Abbau der Fokalkontakte (vgl. Abbildung 3.18).

3.8 M25-Proteine und ND10 *domains*

Bei der Analyse der subzellulären Lokalisation der M25-Proteine ATG2 und ATG6 wurden für beide Proteine kreisförmige Strukturen im Zellkern festgestellt. Durch konfokale Mikroskopie wurde der Nachweis erbracht, dass es sich bei den detektierten Strukturen tatsächlich um Hohlkugel-förmige Aggregate handelte, an denen sich die M25-ATG6-Proteine außenseitig anlagerten (vgl. Abb. 3.8). Dies warf die Frage auf, ob es sich bei diesen Strukturen um bereits bekannte, in der Literatur beschriebene subnukleäre Kompartimente handelt. Zu diesen Kompartimenten, die ähnliche punkt- bzw. ringförmige Strukturen im Zellkern ausbilden, gehören z.B. Cajal Bodies [Cajal, 1903; Ogg and Lamond, 2002], pCG (Polycomb group complex bodies) [Saurin et al., 1998], sogenannte „Nuclear Speckles“ [Lamond and Spector, 2003] und ND10 *domains*, die auch als PML *nuclear bodies* bezeichnet werden (siehe Abschnitt 1.6.1) [Ascoli and Maul, 1991; Dyck et al., 1994].

3.8.1 Kolokalisation von M25-Proteinen mit ND10 *domains*

Aufgrund der teilweise beobachteten ringförmigen Strukturen von M25-Proteinen im Zellkern, die auch charakteristisch für das Erscheinungsbild von ND10 *domains* sind, wurden M25-Protein-exprimierende Zellen auf eine Kolokalisation der M25-Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 mit ND10 *domains* untersucht. Das *Promyelocytic Leucemia-associated-Protein* (PML-Protein) ist eines der „Gerüst“-Proteine der ND10 *domains* (siehe Abschnitt 1.6.1) [Dyck et al., 1994]. Der Nachweis von PML-Proteinen wurde in den folgenden Experimenten als Marker für ND10 *domains* verwendet.

MEF wurden mit den Retroviren pSF M25-ATG2, pSF M25-ATG6 und pSF modb7-2 transduziert. Die Zellen wurden 72 h nach Transduktion fixiert und mit einem HA-Antikörper zur Detektion von M25-Proteinen sowie mit einem Antikörper gegen PML-Proteine gefärbt (siehe Kapitel 2.5). Anschließend wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Sowohl M25-ATG2- als auch M25-ATG6-Proteine kolokalisierten mit PML-Signalen (Abbildung 3.20A). Die M25-Proteine lagen in punkt-, kreis- oder ringförmigen Strukturen

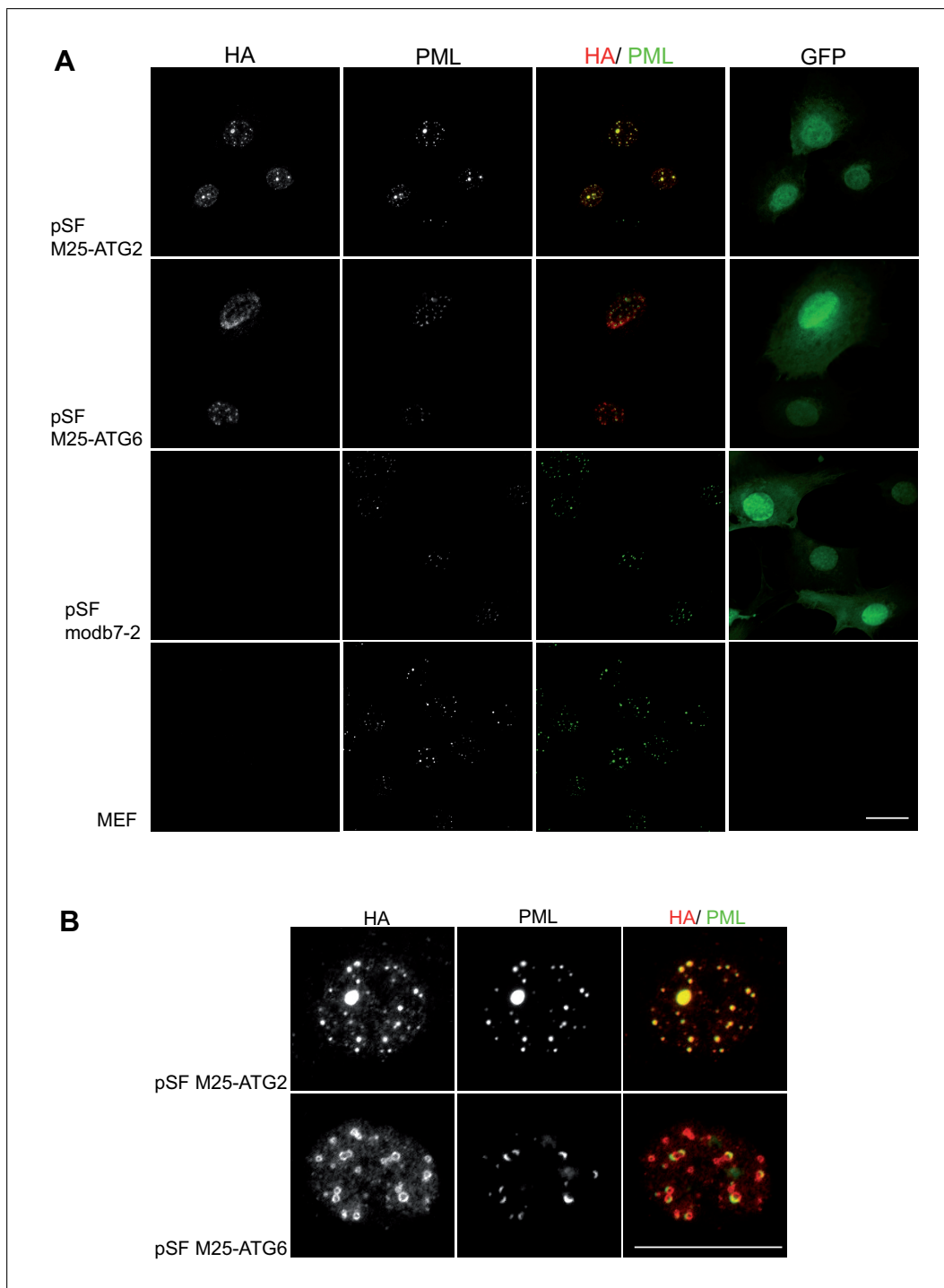


Abbildung 3.20 Kolokalisation der M25-Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 mit nukleären ND10 *domains*. (A) MEF wurden mit den Retroviren pSF M25-ATG2, pSF M25-ATG6 und pSF modb7-2 transduziert. Die M25-Proteine wurden mit einem HA-spezifischen Antikörper und die ND10 *domains* mit einem für das PML-Protein spezifischen Antikörper in transduzierten und nicht transduzierten MEF detektiert. Die retroviral transduzierten Zellen wurden anhand ihrer GFP-Expression identifiziert. Die Analyse erfolgte im konfokalen Laser-scanning-Mikroskop. (B) Detaillierte Ansicht der Kolokalisation von M25-Proteinen mit PML in pSF M25-ATG2- und pSF M25-ATG6-transduzierten MEF. Der Maßstabsbalken entspricht in beiden Abbildungen 20 μm .

vor. Sämtliche ND10 *domains* waren mit den M25-Proteinen M25-ATG2 und M25-ATG6 assoziiert. Es waren jedoch mehr M25-Aggregate als ND10 *domains* im Zellkern vorhanden, so dass nicht alle M25-Proteine mit PML-Proteinen kolokalisierten. M25-ATG2-Proteine zeigten vollständige kreisförmige Kolokalisationen mit den detektierten ND10 *domains* (Abbildung 3.20 B). Bei der Kolokalisation von M25-ATG6-Proteinen mit ND10 *domains* waren zumeist lediglich partielle sichelförmige Überlagerungen erkennbar. In weiteren Untersuchungen zur Kolokalisation wurde teilweise jedoch auch eine vollständige Überlagerung der M25-ATG6-Aggregate mit den ND10 *domains* beobachtet, die dem Erscheinungsbild von M25-ATG2-Aggregaten glichen.

3.8.2 Einfluss von M25-Proteinen auf ND10 *domains*

In Abschnitt 3.8.1 wurde eine Kolokalisation der beiden M25-Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 mit ND10 *domains* detektiert. Auffällig war hier, dass sich die Struktur der ND10 *domains* durch die Expression von M25-Proteinen veränderte. So wurde eine Reduktion der Anzahl der ND10 *domains* im Vergleich zu nicht transduzierten oder mit pSF modb7-2 transduzierten Zellen beobachtet. In nicht transduzierten Zellen ließen sich zwischen 10 und 30 ND10 *domains* pro Zellkern detektieren.

Anzahl und Morphologie von ND10 *domains* sind jedoch variabel, da sich diese aus veränderbaren Komponenten zusammensetzen, die auf äußere, die Zelle beeinflussende Faktoren dynamisch reagieren. So ist z.B. die Expression des PML-Proteins durch Interferon induzierbar. Durch Gabe von Interferon wird die Expression des PML-Proteins gesteigert und die Anzahl der ND10 *domains* vervielfacht sich (siehe Abschnitt 1.6.1) [Lavau et al., 1995; Bloch et al., 1999]. In den folgenden Versuchen wurde daher der Einfluss von retroviral exprimierten M25-Proteinen auf die Struktur und Anzahl der ND10 *domains* mit und ohne Gabe von Interferon β (IFN β) quantifiziert (siehe Abschnitt 2.5.3).

Um das Ausmaß des Einflusses von M25-Proteinen auf die Anzahl der ND10 *domains* zu untersuchen, wurden MEF mit den Retroviren pSF M25-ATG2 und pSF M25-ATG6 transduziert. Zusätzlich wurden MEF mit dem Kontrollvirus pSF modb7-2 transduziert, um den generellen Einfluss der Retrovirus-Infektion auf Anzahl und Struktur der ND10 *domains* darzustellen. Weiterhin wurden nicht transduzierte MEF in Hinblick auf Anzahl der ND10 *domains* untersucht. Die Zellen wurden 72 h nach Transduktion mit einem PML-spezifischen Antikörper gefärbt. Zufällig ausgewählte Bereiche der Deckgläser wurden im Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Anschließend wurde die Anzahl der ND10 *domains* pro Zellkern in den retroviral transduzierten MEF, die durch ihre GFP-Expression detektierbar waren, bestimmt und mit der Anzahl an ND10 *domains* in nicht transduzierten MEF verglichen (siehe Abschnitt 2.5.3).

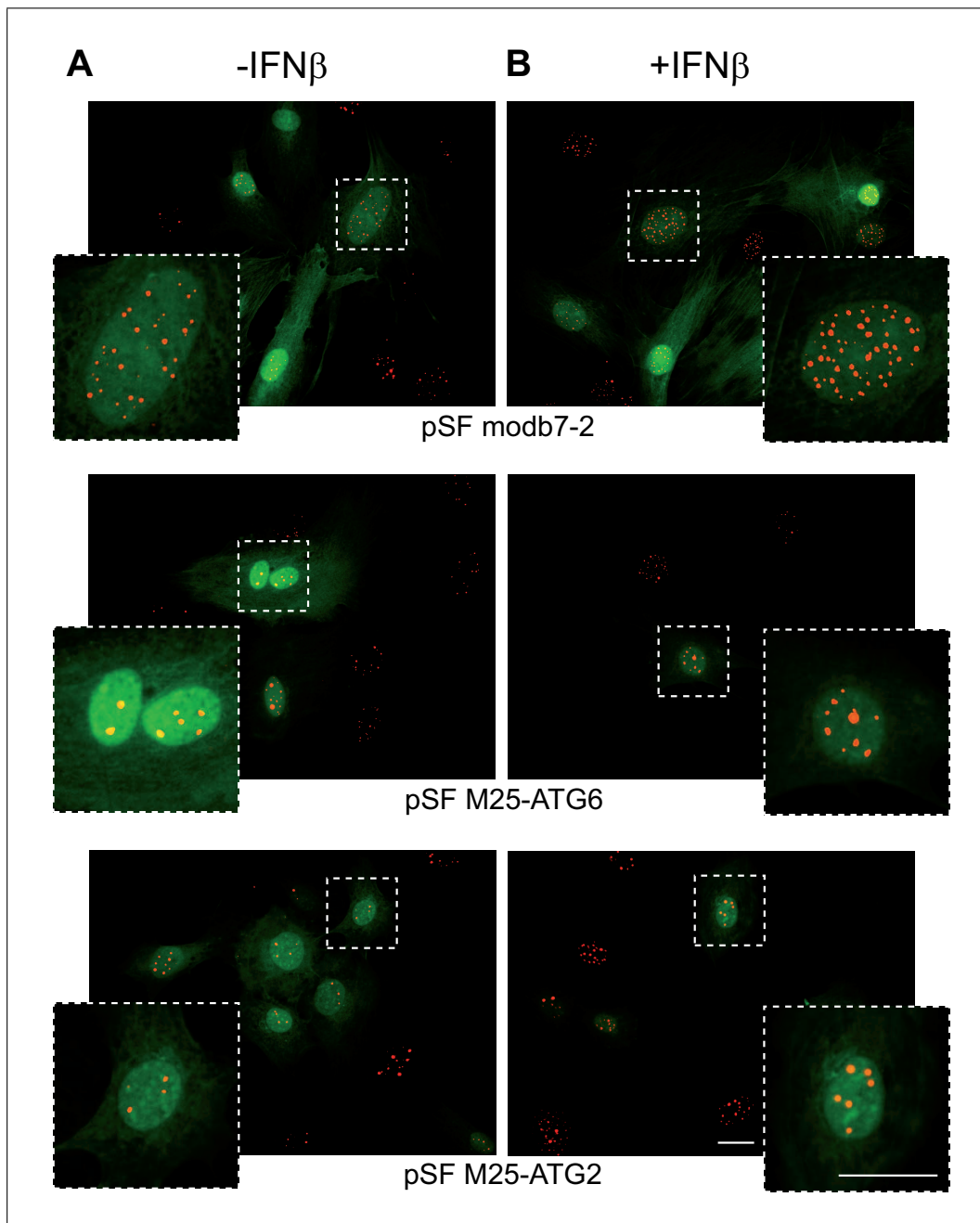


Abbildung 3.21 Veränderung der zellulären ND10 *domains* durch die retrovirale Expression von M25-Proteinen. MEF wurden mit den Retroviren pSF modb7-2, pSF M25-ATG6 und pSF M25-ATG2 transduziert. Die zellulären ND10 *domains* wurden mit einem für das PML-Protein spezifischen Antikörper im Epifluoreszenzmikroskop visualisiert. Transduzierte Zellen waren anhand ihrer GFP-Expression identifizierbar. Die Vergrößerungen zeigen Detailansichten von ND10 *domains* im Zellkern. Die Maßstabsbalken entsprechen 20 μm . (A) Die linke Seite zeigt MEF ohne die Stimulation mit IFN β . (B) Die rechte Seite zeigt MEF, die 48 h nach Transduktion für 24 h mit 1000 U/ml IFN β stimuliert wurden.

Tabelle 3.1 Durchschnittliche Anzahl der ND10 *domains* pro Zellkern in retroviral transduzierten Zellen.

	-IFN	%	+IFN	%
MEF	13	100	31	100
pSF modb7-2	11	85	36	116
pSF M25-ATG2	7	54	16	52
pSF M25-ATG6	5	38	11	35

Die durchschnittliche Anzahl an ND10 *domains* pro Zellkern lag bei M25-ATG2 exprimierenden Zellen bei sieben, bei M25-ATG6 exprimierenden Zellen bei fünf Aggregaten pro Zellkern. In den mit pSF modb7-2 transduzierten Zellen lag die durchschnittliche Anzahl der ND10 *domains* pro Zellkern bei 11, während in nicht transduzierten MEF durchschnittlich 13 ND10 *domains* pro Zellkern gezählt wurden (Abbildung 3.22 und Tabelle 3.1).

In Analogie zum vorherigen Versuch wurde der gleiche Versuch unter Zugabe von IFN β durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben transduziert, 48 h nach Transduktion mit 1000 U/ml IFN β stimuliert und anschließend für weitere 24 h inkubiert. Durch die nachträgliche Gabe von IFN β konnte eine Beeinträchtigung der Transduktion ausgeschlossen werden.

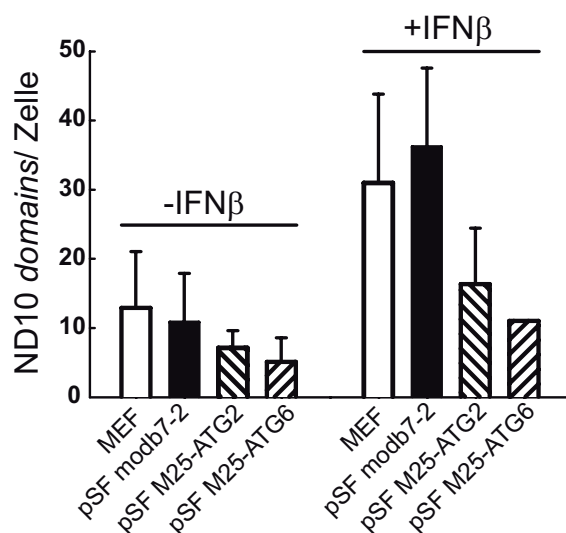


Abbildung 3.22 Anzahl der ND10 *domains* in M25 exprimierenden Fibroblasten. MEF wurden mit den Retroviren pSF modb7-2, pSF M25-ATG2 und pSF M25-ATG6 transduziert und mit oder ohne IFN β (1000 U/ml) inkubiert. Die Anzahl der ND10 *domains* pro Zellkern wurde durch Auszählen der mit einem PML-spezifischen Antikörper detektierten Signale ermittelt.

Durch die IFN β -Gabe erhöhte sich die Anzahl der ND10 *domains* in nicht transduzierten Zellen von durchschnittlich 13 auf 31 ND10 *domains* pro Zellkern. In den mit pSF modb7-2 transduzierten Zellen war ein ähnlicher Anstieg von 11 auf durchschnittlich 36 ND10 *domains* pro Zellkern zu beobachten.

Auch in den Zellen, die M25-Proteine exprimierten, war eine Erhöhung der Anzahl der ND10 *domains* feststellbar. Hier wurden jedoch in Anwesenheit von IFN β in pSF M25-ATG2-transduzierten MEF nur durchschnittlich 16 und in pSF M25-ATG6-transduzierten MEF durchschnittlich 11 ND10 *domains* gezählt. Somit war auch in M25-exprimierenden MEF ein Anstieg der Anzahl an ND10 *domains* erkennbar. Jedoch war in M25-ATG2-exprimierenden Zellen in Ab- und Anwesenheit von IFN β die Anzahl der ND10 *domains* im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen um ca. 50 % reduziert. Auch in M25-ATG6-exprimierenden Zellen blieb, im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen, der prozentuale Anteil der ND10 *domains* in Ab- und in Anwesenheit von IFN β mit 38 % bzw. 35 % gleich (Tabelle 3.1).

Ferner war zu beobachten, dass zwar die Anzahl der ND10 *domains* in M25-exprimierenden Zellen geringer als in Kontrollzellen war, jedoch schien die Größe der ND10 *domains* zuzunehmen (Abbildung 3.21).

Zusammengefasst konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass sich bei Anwesenheit von M25-Proteinen die Anzahl der ND10 *domains* im Zellkern deutlich verringert. Die Expression von M25-Proteinen führte zu einer Einschränkung der IFN β -induzierten Erhöhung der Anzahl der ND10 *domains* in den Zellkernen retroviral transduzierter Zellen.

3.8.3 Einfluss der subzellulären Lokalisation von M25-Proteinen auf ND10 *domains*

In den vorhergehenden Versuchen wurde der Einfluss von M25-Proteinen auf die Anzahl und Struktur von ND10 *domains* beschrieben. Hierbei wurden die nukleär exprimierten M25-Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 untersucht. Durch das Einführen einer Mutation in das Kernimportsignal des M25 ORFs wurde ein M25-Protein hergestellt, das hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert war (vgl. Abschnitt 3.4). Durch eine Analyse der Struktur und Anzahl der ND 10 *domains* in pSF ATG6 NLSmut-exprimierenden Zellen sollte nun der Einfluss der Lokalisation von M25-Proteinen auf die ND10 *domains* untersucht werden.

Dazu wurden MEF mit den Retroviren pSF ATG6 NLSmut, pSF M25-ATG6 und pSF modb7-2 transduziert. 72 h nach Transduktion wurden PML-Proteine sowie M25-Proteine mit spezifischen Antikörpern gefärbt und die Anzahl der ND10 *domains* in den GFP exprimierenden, retroviral transduzierten Zellen und in nicht transduzierten MEF bestimmt (siehe Abschnitt 2.5.3). Dabei wurden Zellen mit und ohne IFN β kultiviert.

In Abbildung 3.23 sind MEF dargestellt, die entweder mit pSF M25-ATG6 oder pSF ATG6 NLSmut transduziert wurden. Wie schon in Abschnitt 3.8.2 beschrieben, war die Anzahl der ND10 *domains* in den M25-ATG6-exprimierenden Zellen relativ gering, wobei sämtli-

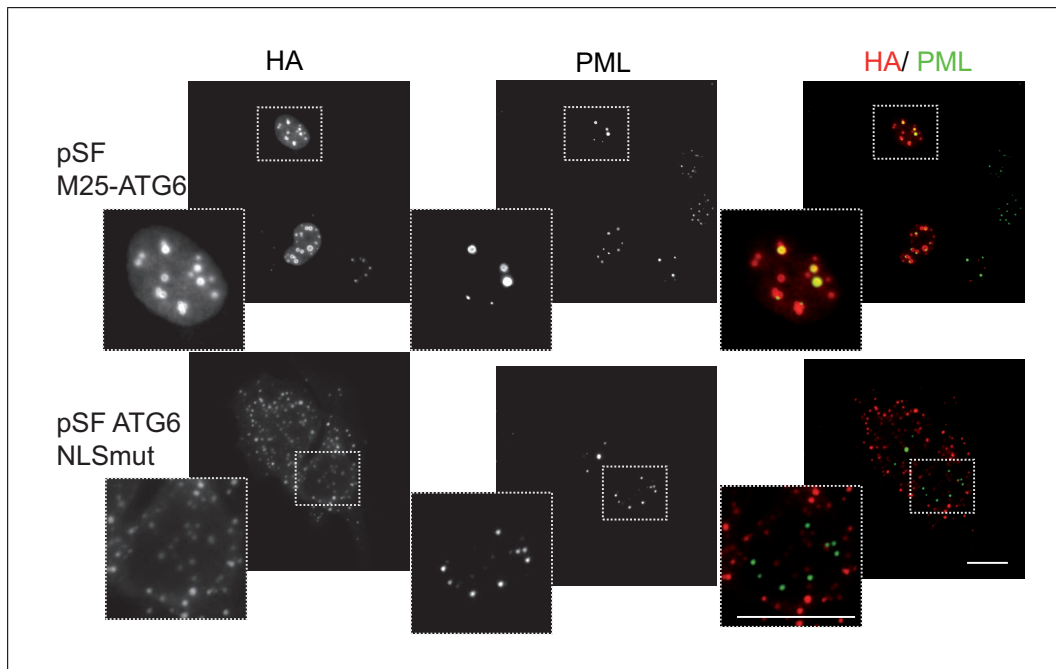


Abbildung 3.23 Morphologie und Lokalisation von ND10 *domains* in M25-ATG6 NLSmut-exprimierenden Fibroblasten. MEF wurden mit den Retroviren pSF M25-ATG6, pSF ATG6 NLSmut sowie mit pSF modb7-2 (hier nicht gezeigt) transduziert. ND10 *domains* wurden mit einem für das PML-Protein spezifischen Antikörper und M25-Proteine mit einem HA-spezifischen Antikörper im Epifluoreszenzmikroskop detektiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 20 μm .

che ND10 *domains* mit M25-Strukturen kolokalisierten. pSF ATG6 NLSmut-transduzierte MEF wiesen dagegen eine deutlich höhere Anzahl an ND10 *domains* auf, dabei wiesen die ND10 *domains* geringere Größen als in M25-ATG6-exprimierenden Zellen auf. In Abwesenheit von $\text{IFN}\beta$ wurden in den pSF M25-ATG6-transduzierten MEF durchschnittlich fünf ND10 *domains* pro Zellkern gezählt, während die durchschnittliche Anzahl an ND10 *domains* in nicht transduzierten Zellen bei 13 und in pSF modb7-2-transduzierten Zellen bei 14 lag (Abbildung 3.24). In Zellen, die das cytoplasmatisch lokalisierte M25-ATG6 NLSmut-Protein exprimierten, waren durchschnittlich 13 ND10 *domains* pro Zellkern vorhanden.

Nach Stimulation der Zellen mit $\text{IFN}\beta$ erhöhte sich die Anzahl der ND10 *domains* pro Zellkern auf durchschnittlich 34 in nicht transduzierten MEF, sowie auf 38 in den modb7-2 exprimierenden Kontrollzellen. M25-ATG6-exprimierende Zellen wiesen nach Interferon-Stimulation im Durchschnitt 11 ND10 *domains* pro Zellkern auf. In pSF ATG6 NLSmut-transduzierten MEF war hingegen eine durchschnittliche Anzahl von 28 ND10 *domains* pro Zellkern zu beobachten. Diese Experimente zeigen, dass sich bei Mutation des Kernimportsignals in der M25-Sequenz die Anzahl der ND10 *domains* nach $\text{IFN}\beta$ -Gabe ähnlich stark erhöht wie in nicht transduzierten MEF. Die Reduktion der Anzahl an ND10 *do-*

mains scheint spezifisch durch die nukleäre Lokalisation von M25-Proteinen ausgelöst zu werden.

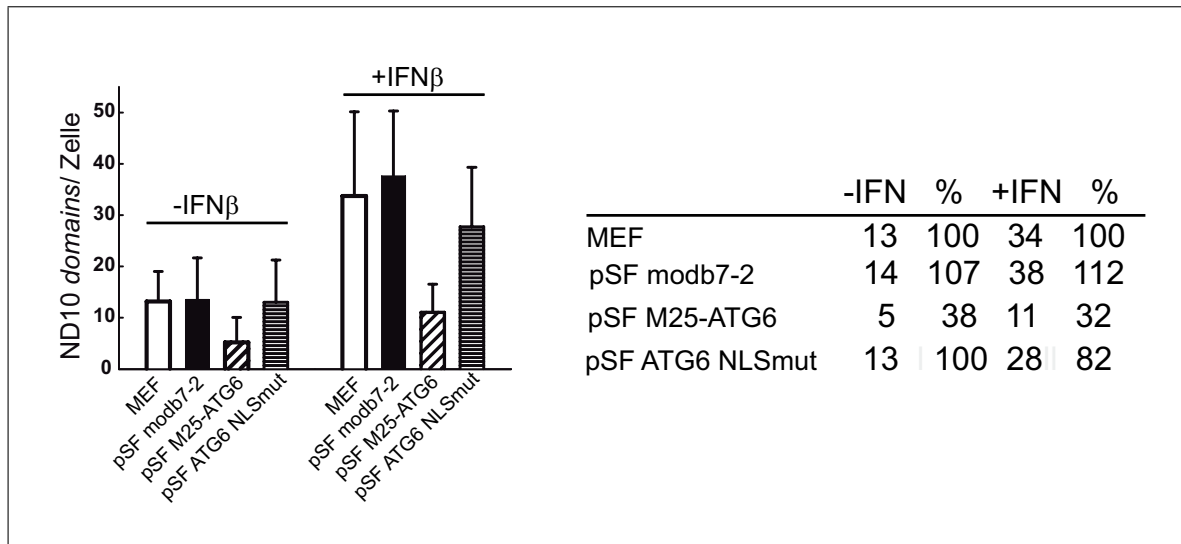


Abbildung 3.24 Anzahl der ND10 *domains* in M25-ATG6 NLSmut-exprimierenden Fibroblasten. MEF wurden mit den Retroviren pSF modb7-2, pSF M25-ATG6 und pSF ATG6 NLSmut transduziert und mit oder ohne IFN β (1000 U/ml) kultiviert. Die Anzahl der ND10 *domains* pro Zellkern wurde durch Auszählen der mit einem PML-spezifischen Antikörper detektierten Signale ermittelt.

3.8.4 Bedeutung der M25-Proteine für die Interferon-Toleranz von MCMV

Vorherige Experimente zeigten, dass die Expression von M25-Proteinen die Struktur von IFN β -induzierbaren Zellkompartimenten beeinflusst. Es stellte sich daher die Frage, ob M25-Genprodukte eine Rolle in der Toleranz von MCMV gegenüber IFN spielen (vgl. Abschnitt 1.4.2). Aus diesem Grund wurde die Replikationsfähigkeit einer M25-Deletionsmutante in Anwesenheit von IFN β untersucht.

Hierzu wurden murine Fibroblasten in Anwesenheit oder Abwesenheit von 500 U/ml Interferon β kultiviert und nach 24 h mit MCMV-GFP und der M25-Deletionsmutante MCMV-GFP Δ M25 mit einer MOI von 0,1 infiziert. Bereits zuvor mit IFN β stimulierten MEF wurde erneut IFN β zugesetzt. Über einen Zeitraum von sechs Tagen wurden infizierten Zellen in 24-stündigem Abstand Proben des Überstands entnommen und anschließend die viralen Titer mittels eines Plaque-Assays auf MEF ermittelt (siehe Abschnitt 2.6.3 und 2.6.5).

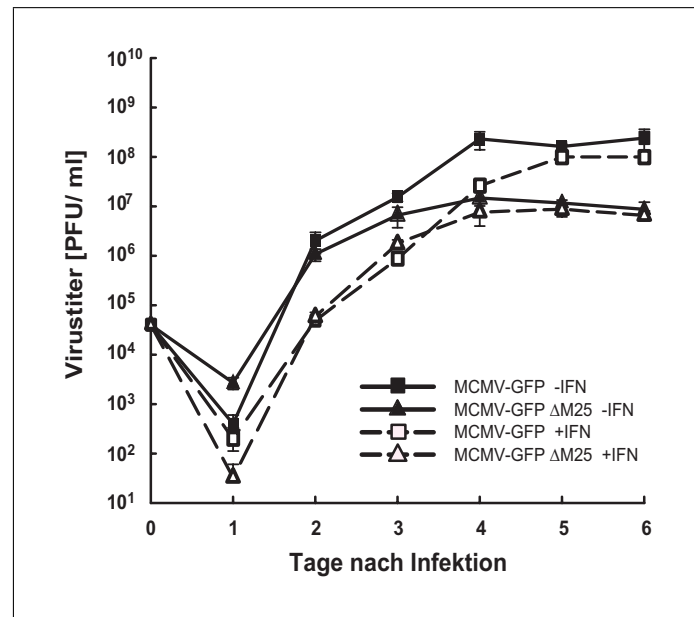


Abbildung 3.25 Replikation von MCMV-GFP und MCMV-GFP Δ M25 in Abhängigkeit von $\text{IFN}\beta$. MEF wurden mit oder ohne 500 U/ml $\text{IFN}\beta$ präinkubiert und anschließend mit MCMV-GFP oder mit MCMV-GFP Δ M25 mit einer MOI von 0,1 infiziert. Zum Zeitpunkt der Infektion wurde den Zellen erneut 500 U/ml $\text{IFN}\beta$ zugesetzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Überstände geerntet und die viralen Titer mit Plaque Assays bestimmt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus drei Parallelansätzen dar.

Beim Vergleich der Replikationskurven von MCMV-GFP und MCMV-GFP Δ M25 in Abwesenheit von $\text{IFN}\beta$ waren bis zum dritten Tag nach Infektion lediglich geringe Unterschiede zwischen beiden Virusvarianten sichtbar (Abbildung 3.25 und Tabelle 3.2). Am vierten Tag erreichte das Wildtyp-Virus Titer von $2,3 \times 10^8$ PFU/ml, während der maximale Titer der Δ M25 Mutante bei $1,5 \times 10^7$ PFU/ml lag. Aus der fehlenden Expression der M25-Proteine in der MCMV-GFP Δ M25-Mutante ergab sich somit eine moderat gesunkene Replikationskompetenz des Virus. Diese Ergebnisse decken sich auch mit den in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Resultaten von Replikationsanalysen.

In Anwesenheit von $\text{IFN}\beta$ wurden die viralen Titer beider Virusvarianten bis zum vierten Tag nach Infektion unterschiedlich stark reduziert. In MCMV-GFP-infizierten Zellen war, im Vergleich zu Zellen, die ohne die Stimulation mit $\text{IFN}\beta$ infiziert worden waren, am ersten Tag nach Infektion lediglich eine zweifache Reduktion des Virustiters durch $\text{IFN}\beta$ zu beobachten (Tabelle 3.2, oben). Erst am zweiten Tag nach Infektion war eine deutliche Verringerung der Virusreplikation in Anwesenheit von $\text{IFN}\beta$ erkennbar. Zu diesem Zeitpunkt gemessene Proben ergaben eine 41-fache Reduktion des MCMV-GFP-Virustiters. Auch am dritten und vierten Tag nach Infektion wurde die Virusreplikation von MCMV-

Tabelle 3.2 Virale Titer von MCMV-GFP und MCMV-GFP Δ M25 in Kulturen mit und ohne IFN β -Stimulation.

	dpi	1	2	3	4	5	6
MCMV	-IFN β	4×10^2	2×10^6	$1,5 \times 10^7$	$2,3 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$
	+IFN β	2×10^2	$4,9 \times 10^4$	$8,8 \times 10^5$	$2,6 \times 10^7$	$9,9 \times 10^7$	$6,4 \times 10^8$
Titerreduktion	(n-fach)	2	41	17	8,8	1,6	0,4
Δ M25	-IFN β	$2,7 \times 10^3$	$1,1 \times 10^6$	$6,7 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$8,7 \times 10^6$
	+IFN β	3×10^1	$5,9 \times 10^4$	$1,8 \times 10^6$	$7,7 \times 10^6$	$8,7 \times 10^6$	$6,6 \times 10^6$
Titerreduktion	(n-fach)	90	19	3,7	2	1,4	1,3

GFP durch IFN β gemindert, jedoch nahm dieser Effekt stetig ab. An Tag 3 nach Infektion waren die viralen Titer in Anwesenheit von IFN β noch um einen Faktor von 17, am Tag 4 nach Infektion nur noch um den Faktor 8,8 reduziert. An den Tagen 5 und 6 waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen den viralen Titern in An- oder Abwesenheit von IFN β mehr festzustellen.

In MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen zeigte IFN β gleich zu Beginn der Infektion einen starken Effekt auf die viralen Titer. So war der Virustiter im Vergleich zu Zellen, die in der Abwesenheit von IFN β mit MCMV-GFP Δ M25 infiziert worden waren, um das 90-fache reduziert (Tabelle 3.2, unten). Jedoch ließ dieser starke Effekt von IFN β auf die Replikation von MCMV-GFP Δ M25 an Tag zwei nach Infektion bereits nach. Zu diesem Zeitpunkt war die Replikation von MCMV-GFP Δ M25 in Anwesenheit von IFN β um das 19-fache reduziert. An den darauf folgenden Tagen waren keine nennenswerten Unterschiede mehr zwischen den Titern der Viren in An- und Abwesenheit von IFN β zu ermitteln.

Ein direkter Vergleich beider Virusvarianten in Anwesenheit von IFN β zeigte, dass das Fehlen des M25 ORFs in MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen die Virusreplikation zu Beginn der Infektion beeinträchtigte. Während in der Abwesenheit von IFN β an Tag eins nach Infektion die Titer des MCMV-GFP Δ M25-Virus mit $2,7 \times 10^3$ PFU/ml sogar über denen von MCMV-GFP (4×10^2 PFU/ml) lagen, waren in Anwesenheit von IFN β die Virustiter der M25-Deletionsmutante (3×10^1 PFU/ml) im Vergleich zu MCMV-GFP (2×10^2 PFU/ml) reduziert (Tabelle 3.2). Zu den Messzeitpunkten am zweiten und dritten Tag nach Infektion war dieser Effekt jedoch nicht mehr zu beobachten.

An den Tagen 4 bis 6 nach Infektion zeigte sich erneut, dass die Replikationsfähigkeit von MCMV-GFP Δ M25 im Vergleich zu MCMV-GFP verringert war, jedoch schien das extern zugefügte IFN β keinen großen Einfluss mehr auf die Replikation beider Virusvarianten zu nehmen. Die Virustiter in An- und Abwesenheit von IFN β waren für beide Virusvarianten vergleichbar.

Insgesamt war somit der Einfluss von $\text{IFN}\beta$ auf die Replikationsfähigkeit von MCMV-GFP ΔM25 zu früheren Zeitpunkten wesentlich stärker als der Einfluss auf die Replikation von MCMV-GFP. Zu späten Zeitpunkten der Infektion war die Replikationsfähigkeit von MCMV-GFP ΔM25 im Vergleich zu MCMV-GFP ebenfalls verringert, jedoch wurde dies vermutlich nicht mehr durch den Einfluss des extern zugegeben $\text{IFN}\beta$ verursacht.

3.9 ND10 *domains* in der MCMV-Infektion

PML-Proteine liegen als heterogene Komplexe mit weiteren Proteinen in ND10 *domains* vor. In den Zellkernen nicht infizierter Zellen finden sich je nach Zelltyp 10 bis 20 dieser Komplexe. Während einer MCMV-Infektion treten Veränderungen dieser Strukturen auf (siehe Abschnitt 1.6.2). Die zuvor durchgeführten Experimente zur Kolo-kalisation von retroviral exprimierten M25-Proteinen mit ND10 *domains* deuten auf eine Verbindung der nukleär lokalisierten M25-Proteine zu Komponenten der ND10 *domains* hin. Ob M25-Proteine an den Veränderungsprozessen der ND10 *domains* zu Beginn einer Infektion beteiligt sind, wurde im Umfeld einer MCMV-Infektion mit MCMV-GFP M25HA untersucht.

3.9.1 Lokalisation von PML-Proteinen in MCMV-infizierten Zellen

In diesem Versuch sollten Veränderungen in der Erscheinung der ND10 *domains* im Verlauf einer MCMV-Infektion in MEF dokumentiert werden. Zudem sollte die Lokalisation von PML-Proteinen und M25-Proteinen miteinander verglichen werden. Dazu wurden MEF mit MCMV-GFP M25HA mit einer MOI von 3 infiziert. Die Zellen wurden 4, 5, 10 und 24 h p.i. fixiert und die PML-Proteine sowie die M25-Proteine mit spezifischen Antikörpern markiert (siehe Kapitel 2.5). Im Fluoreszenzmikroskop wurden die Positionen beider Proteine im Verlauf der Infektion analysiert.

In nicht infizierten Zellen lagen PML-Proteine in kreisförmigen Strukturen in ND10 *domains* im Zellkern vor. Die ND10 *domains* unterschieden sich in ihrer Größe und Anzahl, waren jedoch als deutlich abgegrenzte Strukturen zu erkennen (Abbildung 3.26, mittlere Spalte).

Infizierte Zellen wurden anhand ihrer GFP-Expression identifiziert (nicht gezeigt), konnten jedoch auch anhand der M25HA-Proteine und der diffusen Verteilung der PML-Proteine im Zellkern detektiert werden. Die Auflösung der ND10 *domains* und die Veränderungen in der Lokalisation der PML-Proteine sind hauptsächlich auf die Anwesenheit viraler IE1-Proteine zurückzuführen, welche die deSUMOylierung der PML-Proteine in-

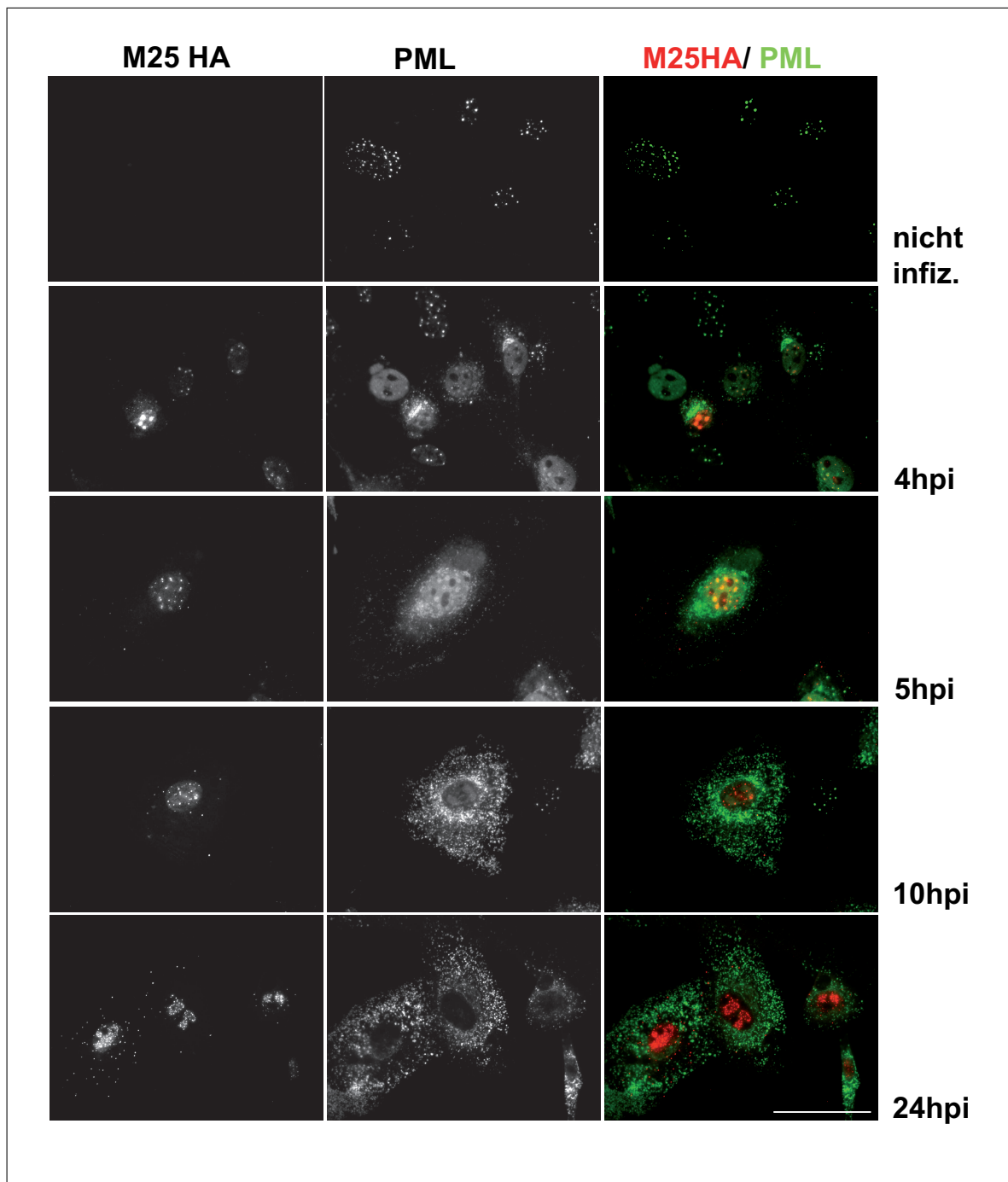


Abbildung 3.26 Einfluss der MCMV-Infektion auf PML-Proteine. MEF wurden mit MCMV-GFP M25HA infiziert. Die subzelluläre Lokalisation der PML-Proteine sowie der M25-Proteine im Verlauf der MCMV-Infektion wurde mit spezifischen Antikörpern im Epifluoreszenzmikroskop detektiert. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

duzieren und so die Struktur der ND10 *domains* zerstören (vgl. Abschnitt 1.6.2) [Müller and Dejean, 1999].

Bereits 4 h p.i. war in infizierten Zellen eine diffuse Verteilung von PML-Proteinen im Zellkern zu beobachten. In einigen Bereichen waren jedoch noch Akkumulationen von PML-Proteinen vorhanden, welche die typischen ND10-domain-spezifischen kreis- bzw. ringförmigen Strukturen zeigten. In einigen Zellkernen lagen PML-Proteine an einer Seite des Zellkerns konzentriert vor. 5 h p.i. verstärkte sich die diffuse Verteilung der PML-Proteine im Zellkern, es waren jedoch weiterhin Akkumulationen von ringförmigen Strukturen zu beobachten. Im Cytoplasma waren punktförmige und diffuse PML-Strukturen nachweisbar, die um den Nukleus verteilt vorlagen.

10 h p.i. waren keine PML-Strukturen mehr im Zellkern detektierbar. Im Cytoplasma kam es dagegen zu einer massiven Anhäufung von PML-Proteinen, hauptsächlich in punktförmigen Strukturen. Diese cytoplasmatische Lokalisation betraf ausschließlich MCMV-infizierte Zellen.

24 h p.i. waren die Zellkerne infizierter Zellen vollständig frei von PML-Proteinen, während sich im Cytoplasma nach wie vor große Mengen an PML-Proteinen befanden.

Dagegen war ein Großteil der M25-Proteine im gesamten Verlauf der Infektion in den Zellkernen infizierter Zellen lokalisiert (Abbildung 3.26, linke Spalte). 4 bis 5 h p.i. kolokalisierten die nukleären M25-Strukturen zum Teil mit den noch verbliebenen ringförmigen PML-Aggregaten. Die im Cytoplasma vorhandenen M25-Proteine zeigten jedoch keine Kolokalisation mit den PML-Strukturen im Cytoplasma.

Im Zuge der zunehmenden cytoplasmatischen Lokalisation der M25-Proteine war 10 und 24 h p.i. keine Kolokalisation zwischen M25-Proteinen und PML-Proteinen mehr zu beobachten.

Die in retroviral transduzierten Zellen beobachtete Kolokalisation von PML- und M25-Proteinen konnte hiermit zu frühen Zeitpunkten der Infektion auch in MCMV-infizierten Zellen bestätigt werden. Zu späteren Zeitpunkten der Infektion behalten die M25-Proteine ihre nukleäre Lokalisation bei, während PML-Proteine im Cytoplasma lokalisieren.

3.9.2 Lokalisation von PML- und M25HA NLS mut-Proteinen im Verlauf der MCMV-Infektion

In Analogie zu den in Abschnitt 3.9.1 gezeigten Versuchen sollte nun untersucht werden, ob durch die Mutation des M25-Kernimportsignals eine Kolokalisation von M25-Proteinen und PML-Proteinen im Cytoplasma erzwungen werden kann.

Dazu wurden MEF mit MCMV-GFP M25HA NLSmut infiziert und 5, 10 und 24 h p.i. fixiert. Nach Anfärbung der M25HA-Proteine und der PML-Proteine mit spezifischen An-

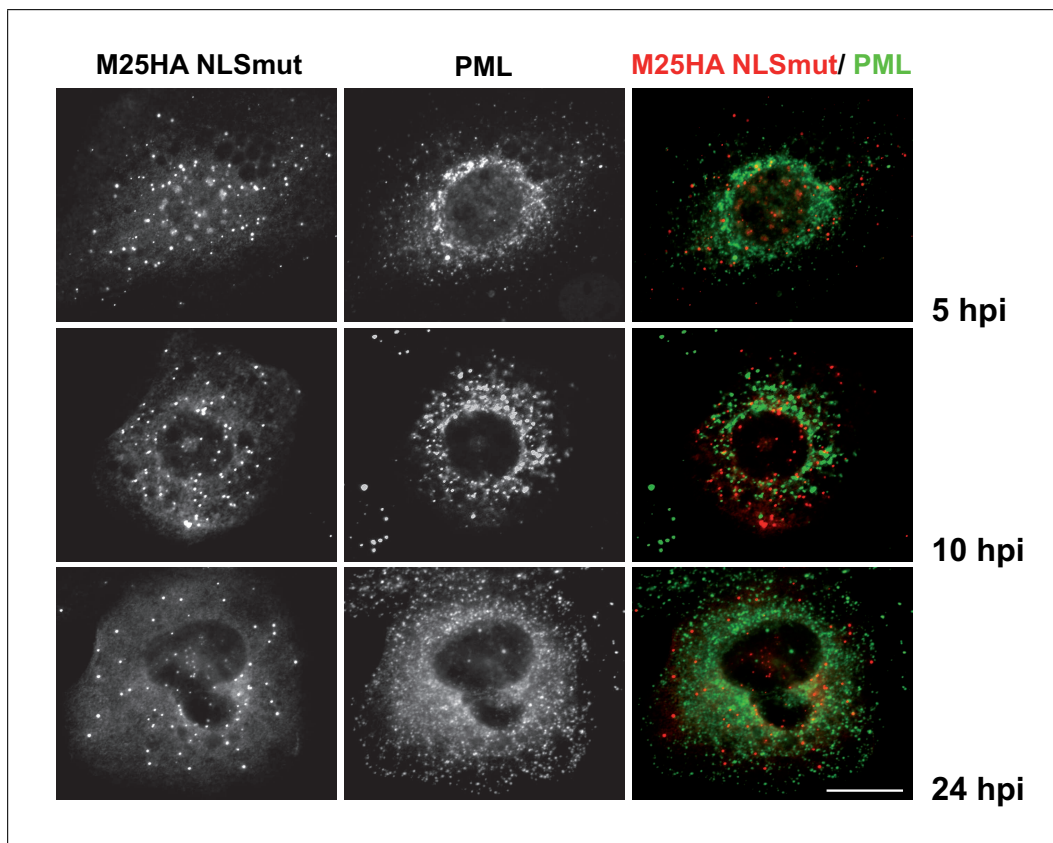


Abbildung 3.27 Subzelluläre Lokalisation von M25HA NLSmut und PML-Proteinen in MCMV-infizierten MEF. MEF wurden mit MCMV-GFP M25HA NLSmut infiziert. Die subzelluläre Lokalisation der PML-Proteine sowie die der M25HA NLSmut-Proteine im Verlauf der Infektion wurde mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Analyse erfolgte im Epifluoreszenzmikroskop. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

tikörpern (siehe Abschnitt 2.5) wurde die subzelluläre Position der Proteine im Verlauf der Infektion im Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abbildung 3.27).

Lediglich 5 h p.i. waren PML-Proteine im Bereich der Zellkerne infizierter Zellen sichtbar, wo diese diffus verteilt vorlagen. Einzelne schwach sichtbare ringförmige Aggregate von PML-Proteinen waren in den ausgewerteten Zellkernen zu beobachten. Ein Großteil der PML-Proteine lag 5 h p.i. bereits im Cytoplasma der MEF vor. Zu späteren Zeitpunkten waren die PML-Proteine ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert.

Auch die M25-Lokalisation war durch die Mutation des Kernimportsignals hauptsächlich auf das Cytoplasma infizierter Zellen beschränkt. Lediglich 5 h p.i. konnten M25-Proteine auch im Zellkern detektiert werden, wobei nicht ersichtlich war, ob sich diese außerhalb oder innerhalb der Kernmembran befanden. In diesen Bereichen waren schwache ringförmige M25-Strukturen zu erkennen, die möglicherweise partiell mit PML-Proteinen kolokalisierten. Zu späteren Zeitpunkten war im Cytoplasma keine Kolokalisation von M25-Proteinen und PML-Proteinen festzustellen.

3.10 Mögliche Modifizierung der M25-Proteine durch SUMO

Eine große Anzahl von nukleär lokalisierten Proteinen weist sogenannte SUMO-Motive bzw. SUMO *interacting motifs* (SIMs) auf (siehe Abschnitt 1.5). Bei Untersuchungen von ND10-assoziierten Proteinen wurden diverse SUMOylierte Proteine identifiziert [Sternsdorf et al., 1999; Jang et al., 2002; Kwek et al., 2001]. Die nukleäre Lokalisation von M25-Proteinen und deren Koloalisation mit ND10 *domains* legen daher die Vermutung nahe, dass M25-Proteine SUMO-Motive bzw. SIMs enthalten könnten.

3.10.1 SUMO *interacting motifs* in der M25-Sequenz

Die Aminosäuresequenz des M25 ORFs wurde auf das Vorhandensein von potentiellen SUMOylierungsstellen und SIMs untersucht. In der M25-Aminosäuresequenz wurde jedoch kein SUMOylierungsmotiv, also die Abfolge einer aliphatischen Aminosäure, Lysin, einer beliebigen Aminosäure und Glutamat (ψ KxE) gefunden (siehe Abschnitt 1.5.2). Im Gegensatz dazu wurden jedoch vier Bereiche in der M25-Aminosäuresequenz identifiziert, die als SIM fungieren könnten. Diese potentiellen SIMs wurden anhand ihrer Reihenfolge in der M25-Aminosäuresequenz als SIM1 bis SIM4 bezeichnet (Abbildung 3.28). Alle vier Bereiche beinhalten mehrere saure Aminosäuren sowie zwei oder drei hydrophobe Aminosäuren. Die potentiellen SIMs sind im Kontext der gesamten M25-Aminosäuresequenz im Anhang dargestellt. Die Analyse der M25-Aminosäuresequenz in Hinblick auf potentielle SUMOylierungsstellen und SIMs erfolgte mit Unterstützung von Prof. Rainer Niedenthal, Institut für physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover.

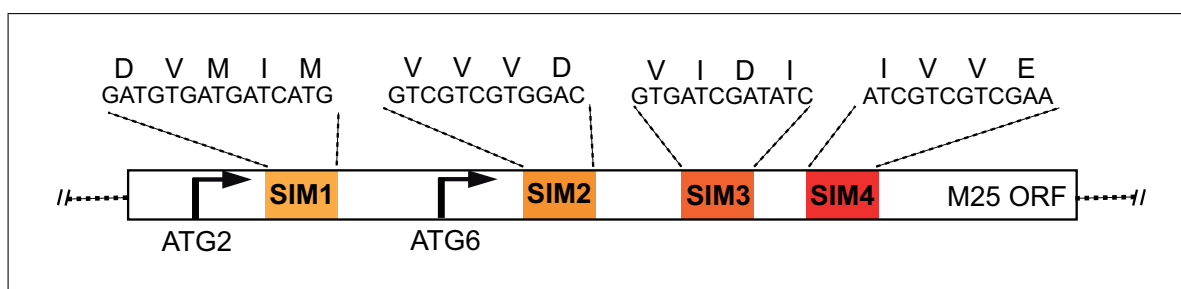


Abbildung 3.28 Schematische Darstellung der potentiellen SUMO *interacting motifs* im M25 ORF. Der M25 ORF ist schematisch dargestellt. Die Positionen der Startcodons für M25-ATG2 bzw. M25-ATG6 sind durch Pfeile gekennzeichnet. Vier potentielle SIMs (SIM1 bis SIM4) wurden identifiziert. Die Nukleotidsequenzen der potentiellen SIMs und die entsprechenden Aminosäuresequenzen sind im Schema angegeben.

3.10.2 Mutation der potentiellen SUMO *interacting motifs* im retroviralen Vektor pSF M25-ATG6

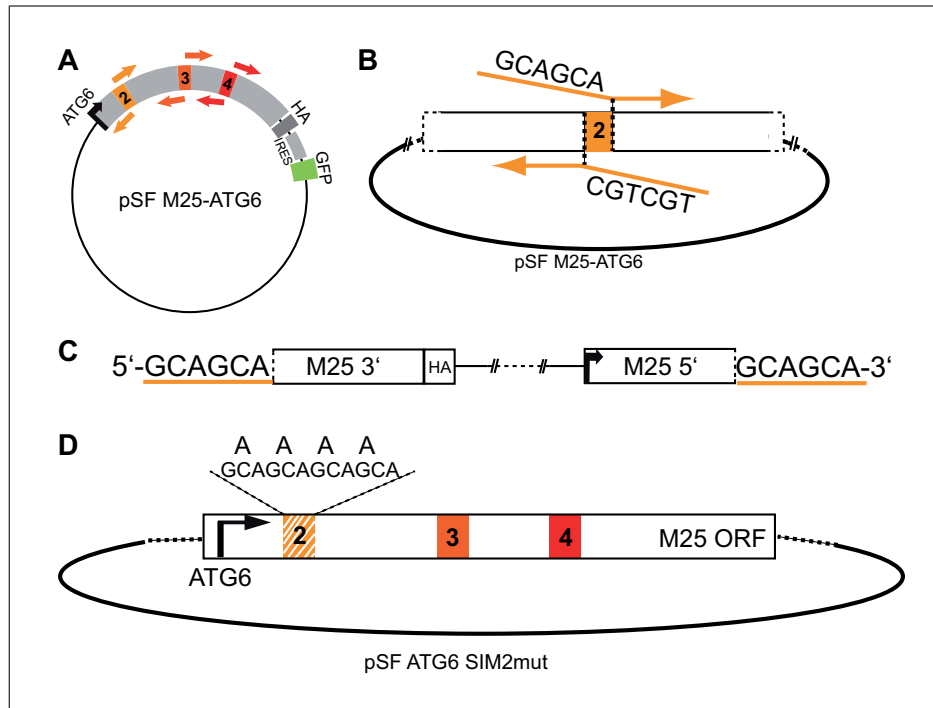


Abbildung 3.29 Mutation der potentiellen SIMs im retroviralen Vektor pSF M25-ATG6. Beispielhaft wird die Strategie zur Mutagenese des SIM2 in pSF M25-ATG6 gezeigt. (A) Schematische Darstellung des retroviralen Vektors pSF M25-ATG6 mit Lage der potentiellen SIMs 2 bis 4. Die Bindungstellen der für die Mutagenese verwendeten Primer sind mit Pfeilen gekennzeichnet. (B) Detaillierte Darstellung der Primerbindestelle für die Mutagenese von SIM2. Die Nukleotidsequenz für die vier Konsensusaminosäuren wurde über die verwendeten Primer mittels einer Quick Mutagenese PCR modifiziert. (C) Das lineare PCR-Produkt trägt die modifizierte Nukleotidsequenz an 5'- und 3'-Ende. (D) Nach Ligation entstand das Plasmid pSF ATG6 SIM2mut.

Durch gezielte Mutation der potentiellen SIMs wurde nun untersucht, ob M25-Proteine mit SUMOylierten Proteinen der ND10 *domains* im Zellkern interagieren (vgl. Abschnitt 1.5). Das potentielle SIM1 liegt innerhalb der Sequenz des M25-ATG2-Proteins, jedoch außerhalb der des M25-ATG6-Proteins (Abbildung 3.28). Da beide Proteine eine identische nukleäre Lokalisation aufwiesen, war auszuschließen, dass dieses Motiv einen Einfluss auf die Lokalisation von M25-Proteinen ausübt. Daher wurden nur die potentiellen SIM2, SIM3 und SIM4 untersucht.

Hierzu wurden jeweils die vier zentralen Aminosäuren des potentiellen SIMs, dargestellt in Abbildung 3.28, im retroviralen Expressionsplasmid pSF M25-ATG6 mit Hilfe einer Quick Mutagenese PCR modifiziert (siehe Abschnitt 2.3.11) und jeweils gegen die un-

polare Aminosäure Alanin ausgetauscht (Abbildung 3.29 A bis D). Die Modifizierungen der potentiellen SIMs in den entstandenen Plasmiden pSF ATG6 SIM2mut, pSF ATG6 SIM3mut und pSF ATG6 SIM4mut wurden durch Sequenzanalysen überprüft. Die Produktion der Retroviren erfolgte in Phoenix-Zellen, wobei durch Verwendung eines ecotropen Hüllproteins die Transduktion muriner Zellen ermöglicht wurde (siehe Abschnitt 2.8.2 und 2.8.4).

3.10.3 Auswirkung der Mutation der potentiellen SIMs auf die Kolokalisation von M25-Proteinen und ND10 *domains*

Mit Hilfe der hergestellten Retrovirus-Varianten wurde der Einfluss der einzelnen potentiellen SIMs auf die subzelluläre Lokalisation des M25-ATG6-Proteins, sowie auf dessen Kolokalisation mit PML-Proteinen untersucht. Hierzu wurden MEF mit den Retroviren pSF M25-ATG6, pSF ATG6 SIM2mut, pSF ATG6 SIM3mut und pSF ATG6 SIM4mut transduziert (siehe Abschnitt 2.8.3). 72 h nach Transduktion wurde die Lokalisation der M25HA-Proteine und PML-Proteine durch Markierung mit spezifischen Antikörpern im Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abbildung 3.30).

Alle M25-Proteinvarianten zeigten in MEF eine nukleäre Lokalisation und bildeten kreis- bzw. ringförmige Strukturen. In den Zellkernen der pSF ATG6 SIM3mut-transduzierten Zellen waren neben diesen ringförmigen Strukturen zusätzliche diffuse M25-Signale zu beobachten. Zwischen den verschiedenen M25-Proteinvarianten konnten Unterschiede in der Kolokalisation mit PML-Proteinen beobachtet werden. pSF M25-ATG6-transduzierte Zellen zeigten die zuvor beschriebene Aggregation von PML-Proteinen in größeren kreisförmigen Strukturen. Auch in MEF, die mit pSF ATG6 SIM2mut oder mit pSF ATG6 SIM4mut transduziert worden waren, waren die PML-Proteine in größeren kreisförmigen Aggregaten lokalisiert. Auch die M25-Proteine bildeten in diesen Zellen größere kreisförmige Aggregate, die deutlich mit den PML-Aggregaten kolokalisierten. In diesen Fällen zeigten, wie bereits zuvor beschrieben, sämtliche ND10 *domains* eine Kolokalisation mit M25 Strukturen. Demnach wurde diese Anordnung weder durch Mutation des potentiellen SIM2 noch durch die des potentiellen SIM4 gestört.

Im Gegensatz dazu wiesen mit pSF ATG6 SIM3mut transduzierte MEF zahlreiche erheblich kleinere, punktförmige PML-Strukturen auf. Größere ringförmige Aggregate waren in diesen Zellen nicht zu beobachten. Auch eine Kolokalisation von M25-Proteinen mit PML-Proteinen war nicht erkennbar. ND10 *domains* und M25-Aggregate stellten sich als deutlich räumlich voneinander getrennte Strukturen dar. Die Größe der ND10 *domains* sowie deren Verteilung im Zellkern glich der von ND10 *domains* in nicht transduzierten MEFs.

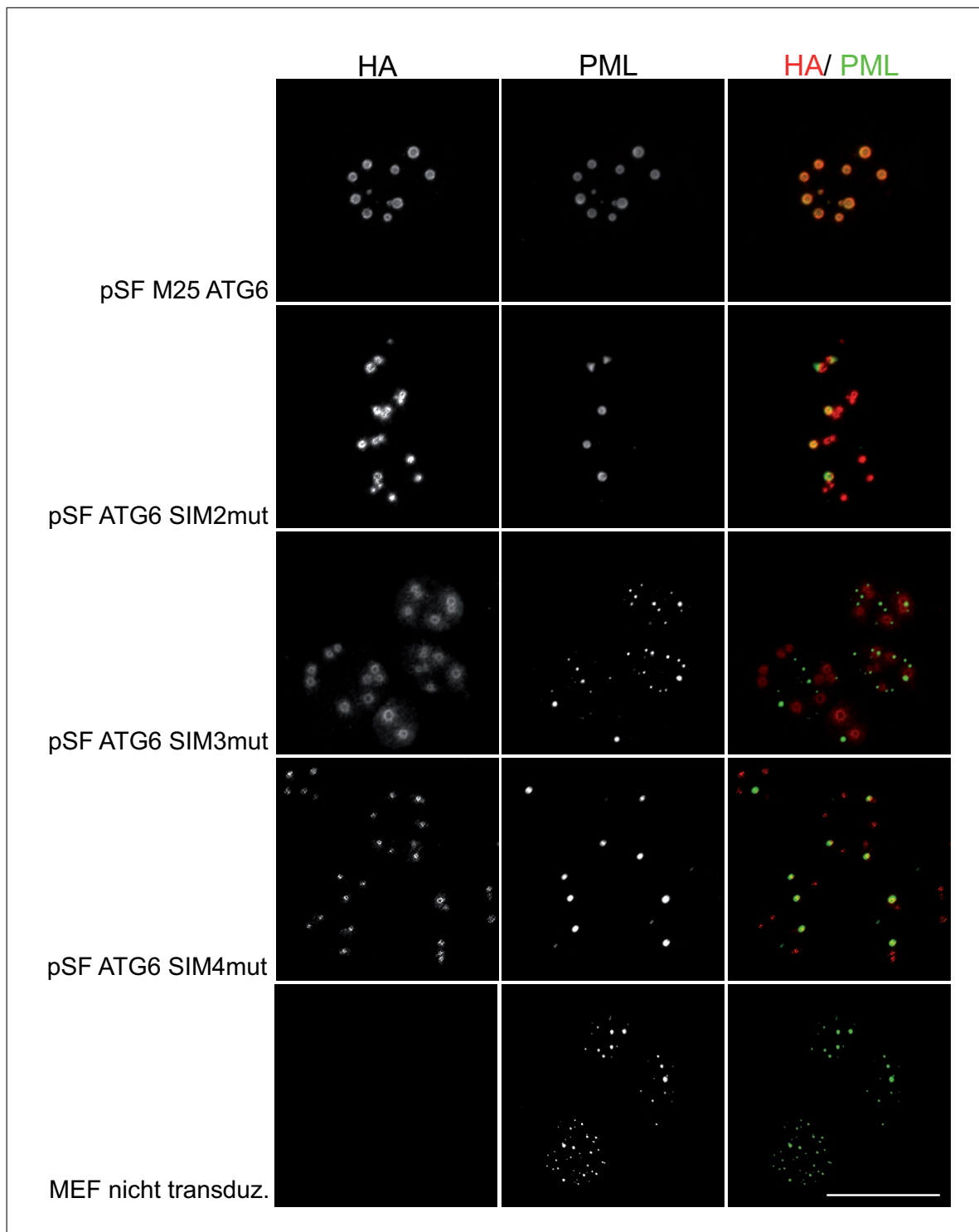


Abbildung 3.30 Subzelluläre Lokalisation der M25 SIM-Varianten und PML-Proteine. MEF wurden mit den Retroviren pSF M25-ATG6, pSF ATG6 SIM2mut, pSF ATG6 SIM3mut und pSF ATG6 SIM4mut transduziert. Durch Färbung mit spezifischen Antikörpern wurde die subzelluläre Lokalisation der M25 SIM-Varianten und die der PML-Proteine visualisiert. Die Analyse erfolgte im konfokalen Laser-scanning-Mikroskop. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Die Mutation des potentiellen SIM3 hatte demnach zwar keinen wesentlichen Effekt auf die subzelluläre Lokalisation von M25-Proteinen, jedoch wurde hierdurch eine Kolokalisation mit ND10 *domains* unterbunden.

KAPITEL 4

DISKUSSION

4.1 M25-Proteine begünstigen die MCMV-Infektion *in vitro*

Die Untersuchung der Replikationsfähigkeit einer M25-Deletionsmutante zeigte, dass die Fähigkeit zur Replikation von MCMV-GFP Δ M25 im Vergleich zu MCMV-GFP verringert ist. Die Titer von MCMV-GFP Δ M25 waren bis zu 50-fach geringer als die des Wildtyp-Virus (Abb. 3.2). Das Fehlen des M25 ORFs führt demnach zu einer Beeinträchtigung, wenn auch nicht zu einem schweren Defekt der Virusreplikation.

Vorherige Untersuchungen einer Transposon-Insertions-Mutante im M25-Locus erbrachten dagegen keine verminderte virale Replikationsfähigkeit [Zhan et al., 2000]. Die Diskrepanz zu den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen kann auf die Verwendung unterschiedlicher Deletionsmutanten zurückzuführen sein. Die Mutation des M25 ORFs durch eine Transposon-Insertion könnte zu einer unvollständigen Deletion des M25-Gens geführt haben, so dass die Expression von M25-Genprodukten nicht vollständig auszuschließen wäre. Durch die vollständige Deletion des M25 ORFs in dem in dieser Arbeit verwendeten Virus wurde dagegen die Synthese sämtlicher M25-Genprodukte ausgeschlossen. Auch in weiteren Replikationsanalysen war in der untersuchten M25-Deletionsmutante eine gleichartige Beeinträchtigung der Replikationsfähigkeit feststellbar [Sengstake, 2009]. Die Übereinstimmung der von Sengstake erzielten Ergebnisse mit den Daten dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass es durchaus zu einer Beeinträchtigung der Virusreplikation durch das Fehlen des M25 ORFs kommt. Die niedrigere Replikation kann jedoch nicht als Ursache für das Ausbleiben des cytopathischen Effekts nach Infektion mit MCMV-GFP Δ M25 erachtet werden, da es zu einer erfolgreichen Produktion von Viruspartikeln und zur Infektion der Fibroblasten kommt, was anhand der GFP-Expression der infizierten Zellen erkennbar ist.

Die Ergebnisse der Replikationsanalysen unterstützen die Hypothese, dass der in Wildtyp-Virus-infizierten Zellen auftretende cytopathische Effekt der Zellabrundung einen positiven Effekt auf die Ausbreitung der Infektion in einer Zellkultur ausübt. Möglicherweise wird in MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen durch das Ausbleiben der Zellabrundung die Verteilung des Virus erschwert, was zu verringerten viralen Titern, wie sie hier gemessen wurden, führen könnte. Ein ähnlicher Effekt wurde beispielsweise für das US3-Protein aus Pseudorabies-Virus (PRV) nachgewiesen. Der Abbau von Aktin-Stressfasern in PRV-infizierten Zellen durch das virale US3-Protein führt zu einer erhöhten Ausbreitung der Viruspartikel *in vitro* [Favoreel et al., 2005]. Die Modifikation des Aktincytoskeletts durch M25-Genprodukte könnte es neu synthetisierten Viruspartikeln erleichtern, die infizierte Zelle zu verlassen, und zur Ausbreitung der Infektion beitragen. Auch könnte es durch die Ablösung der Zellen vom Substrat zu einer größeren Effizienz der Infektion *in vitro* kommen, wenn infizierte Zellen sich in der Zellkulturschale bewegen.

Das Ausbleiben des cytopathischen Effekts der Zellabrundung in Zellen, die mit MCMV-GFP Δ M25 infiziert wurden, könnte durch einen Einfluss auf die Expression weiterer viraler Proteine verursacht werden. Dabei käme es zu einer verlangsamten Expression viraler Proteine, was eine verlangsamte Reaktion der gesamten Zelle auf die Virusinfektion verursachen könnte. Hierdurch könnte das Auftreten des cytopathischen Effekts der Zellabrundung verzögert werden.

Aus diesem Grund wurde die Expression viraler Proteine untersucht, die charakteristisch für die *immediate early*-, *early*- und *late*-Stadien der MCMV-Infektion sind. Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, waren jedoch keine nennenswerten Verzögerungen in der viralen Proteinexpression in MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen zu beobachten. Die im Immunoblot gezeigte leicht verspätete Expression der viralen Proteine IE1, E1 und eines uncharakterisierten *late*-Proteins (Abb. 3.1) konnte in weiteren Versuchen nicht beobachtet werden. Zum Teil wurden sogar gegenteilige Effekte beobachtet (Ergebnisse nicht gezeigt). Das Ausbleiben des cytopathischen Effekts der Zellabrundung in MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen ist daher nicht auf einen verzögerten Ablauf der Infektion bzw. auf eine verlangsamte Proteinexpression zurückzuführen.

Zusammengefasst zeigten die hier dargestellten Ergebnisse, dass die virale Replikation nicht primär von der Anwesenheit des M25 ORFs abhängig ist. Das Fehlen des cytopathischen Effekts der Zellabrundung in MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen ist nicht auf eine veränderte virale Proteinexpression zurückzuführen. Es wäre jedoch möglich, dass die Zellabrundung einen positiven Einfluss auf die Ausbreitung von MCMV *in vitro* ausübt.

4.2 Subzelluläre Lokalisation der M25-Proteine

Um Informationen über die Funktionsweise der M25-Proteine zu erhalten, wurde die subzelluläre Lokalisation der Proteine untersucht. Hierbei wurde zum einen die Lokalisation der Proteine im Verlauf der MCMV-Infektion betrachtet. Zum anderen wurde die Lokalisation der beiden größten vom M25 ORF synthetisierten Proteine, M25-ATG2 und M25-ATG6, durch die Expression in retroviralen Vektoren untersucht.

4.2.1 M25-Proteine lokalisieren im Zellkern, später auch im Cytoplasma MCMV-infizierter Zellen

Mittels der C-terminalen HA-Markierung der M25-Proteine war es möglich, die Lokalisation von M25-Proteinen in infizierten Zellen zu verfolgen (Abb. 3.3). Während der MCMV-Infektion wurde die subzelluläre Lokalisation sämtlicher durch den M25 ORF kodierter Proteine mit HA-Markierung visualisiert (Abb. 3.4).

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass weitere M25-Genprodukte synthetisiert werden, die eine Verkürzung im C-terminalen Bereich aufweisen. Diese Proteinspezies würden möglicherweise durch die C-terminale HA-Markierung nicht detektiert werden. Die Ergebnisse der Analyse von M25-RNA-Transkripten und der im M25 ORF vorhandenen Start-Codons durch Sengstake [2009] weisen jedoch darauf hin, dass sämtliche M25-Genprodukte einen identischen C-Terminus besitzen (vgl. Abschnitt 1.3.2).

Der Großteil der Proteine wurde im Zellkern, ein geringerer Anteil im Cytoplasma detektiert. Zu frühen Zeitpunkten der Infektion waren die Proteine diffus im Nukleoplasma verteilt, im Verlauf der Infektion bildeten sich jedoch zunehmend kreisförmige Aggregate. Zu späten Zeitpunkten der Infektion wurden M25-Proteine auch im Cytoplasma detektiert, wo sie sowohl um den Zellkern herum akkumulierten, als auch in kreisförmigen Aggregaten im Cytoplasma verteilt waren. Gleichzeitig blieb aber die nukleäre Lokalisation auch zu späten Zeitpunkten der Infektion bestehen.

Frühere Arbeiten durch Wu et al. [1999] und Sengstake [2009] wiesen bereits auf die Lokalisation der M25-Proteine in verschiedenen Zellkompartimenten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion hin. In beiden Arbeiten wurden M25-Proteine jedoch frühestens 12 h p.i. detektiert, wobei ebenfalls kreisförmige Strukturen im Zellkern beobachtet wurden. Auch eine Akkumulation von M25-Proteinen in der Umgebung des Zellkerns wurde beobachtet. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurden in dieser Arbeit M25-Proteine bereits 4 h p.i. im Zellkern detektiert. Zudem lagen hier auch zu späteren Zeitpunkten M25-Proteine noch im Zellkern vor, wo sie eine starke Akkumulation in bestimmten Bereichen des Zellkerns aufwiesen.

Für frühe Zeitpunkte der Infektion (4 h p.i.) ist anzunehmen, dass sich die M25-Proteine nach der Synthese teilweise noch im Cytoplasma befinden, und anschließend in den Zellkern transportiert werden. Hierauf kann das diffuse cytoplasmatische und nukleäre HA-Signal begründet sein. Im weiteren Verlauf der Infektion scheint es zu einer Zusammenlagerung von M25-Proteinen zu den beobachteten kreisförmigen Aggregaten im Zellkern zu kommen. Welche Mechanismen zur Bildung dieser Aggregate führen könnten, wird in Abschnitt 4.4.1 erörtert.

Wu et al. identifizierten zudem das 130 kDa M25-Protein als Bestandteil von MCMV-Virionen, in die es als Tegument-Protein inkorporiert wird [Wu et al., 1999]. In gereinigten Viruspartikeln konnte nur das 130 kDa M25-ATG2-Protein detektiert werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich auch M25-Proteine geringerer molekularer Masse im Tegument befinden, die unterhalb der Detektionsgrenze liegen. Darauf weisen auch die Ergebnisse von massenspektrometischen Analysen hin, bei denen mehrere unterschiedlich große M25-Peptide in MCMV-Viruspartikeln identifiziert wurden [Kattenhorn et al., 2004]. Da die Tegumentation der MCMV-Partikel im sogenannten „Cytoplasmic assembly compartment“ im Trans-Golgi-Network stattfindet [Sanchez et al., 2000], ist davon auszugehen, dass die zu späten Zeitpunkten detektierten Akkumulationen von M25-Proteinen um den Zellkern herum neu assemblierten Viruspartikeln entsprechen (vgl. Abschnitt 1.1.3). Hierauf weisen auch Immunfluoreszenzfärbungen hin, in denen 24 h p.i. M25-Proteine in der Nähe des Golgi-Apparats detektiert wurden [Sengstake et al., 2010] (in Vorbereitung).

4.2.2 Die M25-Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 zeigen eine identische nukleäre Lokalisation

Aufgrund der C-terminalen HA-Markierung der M25-Proteine im MCMV-Genom waren die verschiedenen M25-Genprodukten nicht zu unterscheiden. Aus diesem Grund wurden die zwei größten M25-Proteine einzeln exprimiert. Untersuchungen von Sengstake wiesen darauf hin, dass ein Translationsbeginn am zweiten ATG im M25 ORF zur Synthese des 130 kDa-Proteins (M25-ATG2) führt, während die Synthese des 105 kDa-Proteins (M25-ATG6) am sechsten ATG im M25 ORF initiiert wird (vgl. Abschnitt 1.3.2). Beide Proteine wurden mit Hilfe retroviraler Vektoren exprimiert (Abb. 3.5).

Das retrovirale System wurde verwendet, um sowohl die Struktur als auch die Adhäsion der Zellen möglichst wenig durch den Vorgang einer Transfektion mit Expressionskonstrukten zu beeinträchtigen. Weiterhin wurde das retrovirale System verwendet, um auch primäre Zellen effizient transduzieren zu können.

Neben den beiden erwarteten Proteinen wurde durch die retrovirale Expression jeweils auch ein Protein mit einem molekularen Gewicht von ca. 90 kDa synthetisiert (Abb. 3.6).

Wu et al. detektierten dieses Protein ebenfalls und zeigten durch *Pulse-chase*-Experimente, dass es sich bei diesem Protein vermutlich nicht um ein Degradationsprodukt der größeren M25-Proteine handelt [Wu et al., 1999]. Es ist davon auszugehen, dass in den für die retrovirale Expression verwendeten Sequenzen die Information für die Synthese dieses kleineren M25-Proteins enthalten ist. So befinden sich im M25 ORF weitere Startcodons, die die Synthese weiterer M25-Proteine initiieren könnten (vgl. Abschnitt 1.3.2).

Aufgrund der Ergebnisse der M25-Lokalisation während der MCMV-Infektion war zu vermuten, dass die verschiedenen M25-Produkte in unterschiedlichen zellulären Bereichen lokalisieren. Wu et al. [1999] beobachteten für das 105 kDa-Protein eine vorherrschende nukleäre Lokalisation zu den Zeitpunkten zwischen 12 bis 24 h p.i. Das 130 kDa-Protein wurde dagegen als hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiertes Protein zu späten Zeitpunkten der Infektion beschrieben. Auch Sengstake [2009] zeigte, dass die 105 kDa- und die 130 kDa-Proteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten synthetisiert werden (vgl. Abschnitt 1.3.2). Ein M25-Protein könnte demnach nukleär und ein weiteres cytoplasmatisch lokalisiert sein.

Die Überprüfung dieser Hypothese mittels der Expression beider M25-Proteine durch Retroviren ergab jedoch, dass sich sowohl das 130 kDa-Protein M25-ATG2 als auch das 105 kDa-Protein M25-ATG6 größtenteils im Nukleus transduzierter Zellen befinden (Abb. 3.7). In beiden Fällen war lediglich ein geringer Anteil der Proteine im Cytoplasma detektierbar, während der Hauptteil der Proteine die schon bei der MCMV-Infektion beobachteten kreisförmigen Strukturen im Nukleus bildete.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die subzelluläre Lokalisation der M25-Proteine während der MCMV-Infektion durch die Anwesenheit weiterer viraler Faktoren beeinflusst wird. Sofern, wie von Wu et al. [1999] vermutet, tatsächlich das M25-ATG2-Protein in das Tegument neu entstehender Viruspartikel inkorporiert wird, ist es möglich, dass der N-terminale Bereich des M25-ATG2-Proteins diesen Einbau vermittelt. Dies würde die cytoplasmatische Lokalisation zu späten Zeitpunkten der Infektion erklären. Durch die Interaktion mit anderen viralen Proteinen im Cytoplasma könnte das Kernimportsignal des M25-ATG2-Proteins maskiert werden, so dass kein Transport in den Zellkern mehr stattfindet.

Um die Lokalisation der einzelnen M25-Proteine während einer MCMV-Infektion näher zu untersuchen, wäre eine Mutation der N-terminalen Domäne des M25-ATG2-Proteins im MCMV-Genom sinnvoll. In diesem Fall wäre keine Interaktion mit viralen Proteinen bei der Tegumentbildung und entsprechend keine Inkorporation in die Viruspartikel zu erwarten. Auch eine gleichzeitige Infektion mit einer M25-Deletionsmutante und Transduktion mit den einzelnen retroviral exprimierten M25-Varianten könnte eine Antwort auf die Frage liefern, ob M25-ATG2-Proteine tatsächlich aufgrund einer Interaktion mit anderen viralen Proteinen im Cytoplasma verbleiben und ins Tegument inkorporiert werden.

4.3 MCMV-unabhängige Induktion der Zellabrundung durch M25-Proteine

Durch die retrovirale Expression der M25-Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 war es möglich, den Einfluss dieser beiden Proteine unabhängig von einer MCMV-Infektion zu untersuchen. Weiterhin wurde die Bedeutung der subzellulären Lokalisation der M25-Proteine für die Zellabrundung analysiert. Im Rahmen einer MCMV-Infektion wurde der Effekt von M25-Proteinen auf Bestandteile der zellulären Fokalkontakte untersucht.

4.3.1 Die M25-Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 induzieren morphologische Veränderungen in Fibroblasten

Versuche zur Expression der Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 erbrachten das Ergebnis, dass beide Proteine ähnliche Eigenschaften hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation aufweisen. Diese Übereinstimmung in der subzellulären Lokalisation der beiden M25-Proteine lässt die Vermutung zu, dass beide Proteine auch ähnliche Funktionen in der Zelle ausüben (siehe Abschnitt 4.5).

Die einzelne Expression von M25-ATG2 und M25-ATG6 zeigte in der Tat, dass beide Proteine eine veränderte Morphologie der transduzierten Zellen hervorrufen (Abb. 3.15). Sowohl das M25-ATG2- als auch M25-ATG6-Proteine sind nach exklusiver Expression durch retrovirale Vektoren in der Lage, eine Abrundung und Verkleinerung von MEF herbeizuführen. Dabei ist die von beiden Proteinvarianten ausgelöste Veränderung der Zellmorphologie nicht von der Anwesenheit weiterer MCMV-Faktoren abhängig. Das M25-ATG6-Protein zeigte hierbei einen stärkeren Effekt auf die Größe der untersuchten Zellen als M25-ATG2. Möglicherweise ist dies auf Unterschiede in der Qualität der verwendeten Retroviren zurückzuführen, da während der Produktion der Retroviren nicht auf besonders stark M25-exprimierende Viren selektiert wurde, sondern der gesamte Zellkulturüberstand ohne weitere Selektion verwendet wurde.

Eine weitere Ursache für den geringeren Effekt auf die Zellverkleinerung durch M25-ATG2-Proteine könnte aber auch in der zusätzlichen N-terminalen Sequenz des M25-ATG2-Proteins begründet sein. Der N-Terminus des M25-ATG2-Proteins, der in M25-ATG6 fehlt, ist offensichtlich für die Induktion der Zellabrundung nicht essentiell. In Abschnitt 4.2.1 wurde die These aufgestellt, dass die N-terminale Sequenz für die Integration des M25-ATG2-Proteins in das Tegument verantwortlich sein könnte. Wenn dies der Fall wäre, könnte die Lokalisation des M25-ATG2-Proteins durch das Vorhandensein von weiteren viralen Proteinen, z.B. Kapsid-Bestandteilen, beeinflusst werden. Da diese viralen Faktoren in der retroviralen Transduktion fehlen, könnte die physiologische Funktion des M25-ATG2-Proteins gestört sein, so dass es wie das M25-ATG6-Protein im Zellkern lo-

kalisiert. Wie die Ergebnisse in Abschnitt 3.6.1 zeigen, ist das M25-ATG2-Protein zwar in der Lage, eine Verkleinerung der transduzierten Zellen zu induzieren, der N-Terminus könnte aber diese Funktion beeinträchtigen, indem er z.B. die Interaktion mit anderen zellulären Proteinen behindert. Um diese Hypothese zu untersuchen, wäre es sinnvoll, die Lokalisation beider M25-Proteine während einer MCMV-Infektion zu analysieren. Hierzu können z.B. die Startcodons im M25 ORF, die die Synthese des M25-ATG6-Proteins und weiterer M25-Proteine initiieren, mutiert werden, um so die Lokalisation des M25-ATG2-Proteins im Umfeld einer MCMV-Infektion zu untersuchen.

Unklar ist, welche Funktion das M25-ATG2-Protein im Tegument der Viruspartikel ausüben könnten. Es wäre denkbar, dass die zu Beginn einer Infektion mit dem Tegument ins Cytoplasma transportierten M25-ATG2-Proteine die Abrundung infizierter Zellen zu frühen Zeitpunkten induzieren. Ob die im Tegument vorhandenen M25-ATG2-Proteine jedoch ausreichen, diesen Effekt auszulösen, müsste untersucht werden. Hierzu könnte die virale Transkription inhibiert werden, um so gezielt den Einfluss der M25-ATG2-Tegument-Proteine auf die Morphologie infizierter Zellen zu untersuchen. Auch eine Infektion mit UV-inaktivierten Viruspartikeln, wie es z.B. für die HCMV-Infektion bereits untersucht wurde [Hirai et al., 1977], könnte Aufschlüsse darüber liefern, ob M25-ATG2- oder evtl. weitere im Tegument vorhandene M25-Proteine einen cytopathischen Effekt auch ohne eine *de novo*-Synthese viraler Proteine auslösen.

Im Kontext mit den oben beschriebenen Ergebnissen zur subzellulären Lokalisation der M25-Proteine während der MCMV-Infektion, wäre das M25-ATG2-Protein folglich an mindestens zwei Funktionen während der Infektion beteiligt. Zum einen könnte die N-terminale Domäne des Proteins seinen Einbau in das Tegument neu entstehender Viren vermitteln, ein Vorgang, der nur in Anwesenheit weiterer viraler Proteine stattfinden kann. Zum anderen ist das M25-ATG2-Protein, wie auch das M25-ATG6-Protein in der Lage, eine Abrundung und Verkleinerung infizierter Zellen auszulösen. Die letztere Funktion ist unabhängig von der Anwesenheit weiterer viraler Faktoren.

4.3.2 Nukleäre und cytoplasmatische M25-Proteine induzieren Veränderungen in der Zellmorphologie

Die Analyse der Aminosäuresequenz des M25 ORFs führte zur Identifizierung eines Kernimportsignals (Abb. 3.9). Durch die Mutation dieses Signals in der Sequenz des M25-ATG6-Proteins wurde untersucht, ob das identifizierte Kernimportsignal tatsächlich für die nukleäre Lokalisation von M25-Proteinen verantwortlich ist (Abb. 3.10). Zudem wurde auch das Kernimportsignal des M25 ORFs im MCMV-Genom mutiert, um die nukleäre Lokalisation sämtlicher M25-Proteine zu analysieren (Abb. 3.12).

Ein Großteil der M25-Proteine befand sich nach Mutation des Kernimportsignals im Cytoplasma transduzierter (Abb. 3.11) und infizierter (Abb. 3.14) Zellen. Durch die Mutation des Kernimportsignals in der Sequenz des M25-ATG6-Proteins und im MCMV-Genom konnte für sämtliche M25-Genprodukte gezeigt werden, dass das identifizierte Kernimportsignal für die nukleäre Lokalisation der M25-Proteine verantwortlich ist. Immunoblot-Analysen belegen zudem, dass durch die Mutation des Kernimportsignals des M25 ORFs im MCMV-Genom weder die Synthese der verschiedenen M25-Genprodukte noch die Expression M25-unabhängiger viraler Proteine (IE1) beeinträchtigt wird (Abb. 3.13).

Allerdings befand sich sowohl nach retroviraler Transduktion als auch nach Infektion mit MCMV möglicherweise eine geringe Menge an M25-Proteinen im Zellkern. Die M25-Proteine, die sich trotz Mutation des Kernimportsignals im Zellkern der Fibroblasten befanden, könnten z.B. durch Ko-Transport mit anderen Proteinen in den Nukleus gelangt sein. Der Transport von Proteinen in den Zellkern ist nicht ausschließlich auf die Existenz eines Kernimportsignals begründet. So ist es möglich, dass auch Proteine, in deren Sequenz kein Kernimportsignal vorhanden ist, in den Zellkern transportiert werden. Moleküle, die eine geringere molekulare Masse als 40 kDa besitzen, können frei durch die Kernporenkomplexe hindurch diffundieren. Auch ist es möglich, dass Proteine durch Ko-Transport mit weiteren Proteinen in den Zellkern importiert werden [Lombardo et al., 2000].

Um die Relevanz der nukleären Lokalisation von M25-Proteinen zur Initiation der Zellabrundung zu untersuchen, wurde die maximale Länge von Zellen gemessen, die mit dem Retrovirus pSF ATG6 NLSmut transduziert worden waren (Abb. 3.16). Für andere DNA-Viren sind Proteine mit Aktin-modifizierenden Funktionen beschrieben, bei denen eine nukleäre Lokalisation von Bedeutung ist. Für den Fall des durch Pseudorabies Virus (PRV) kodierte US3-Proteins wurde gezeigt, dass der Abbau von Aktin-Stressfasern nur bei nukleärer Lokalisation des US3-Proteins erfolgt [Van Minnebruggen et al., 2003]. Auch das von Vaccinia Virus (VV) kodierte F11L-Protein, welches das kortikale Cytoskelett infizierter Zellen modifiziert, zeigt eine hauptsächlich nukleäre Lokalisation (vgl. Abschnitt 1.2.3) [Arakawa et al., 2007; Morales et al., 2008].

Im Gegensatz hierzu war im Rahmen dieser Arbeit trotz der cytoplasmatischen Lokalisation des M25-ATG6-Proteins eine deutliche Abrundung und Verkleinerung der transduzierten Zellen zu beobachten. Nach Mutation des Kernimportsignals des M25 ORFs im MCMV-Genom wurde ebenfalls eine Abrundung und Verkleinerung der infizierten Zellen beobachtet (Abb. 3.17). Allerdings war in beiden Fällen immer noch ein geringer Anteil an M25-Proteinen im Zellkern detektierbar. Möglicherweise reicht dieser kleine nukleäre Anteil bereits aus, um eine Zellabrundung zu induzieren. Gegen diese These spricht jedoch, dass der Effekt der Zellabrundung nach Mutation des Kernimportsignals sogar noch stärker war, als in gleichzeitig vermessenen M25-ATG6-exprimierenden Zellen.

Diese Beobachtung führt zu einer zweiten Hypothese. So war nicht nur der Effekt der Zellabrundung in pSF ATG6 NLSmut-transduzierten Zellen besonders stark, es schien nach Mutation des Kernimportsignals auch insgesamt eine größere Menge an M25-Proteinen synthetisiert zu werden, was sich aus einer wesentlich größeren Anzahl an M25-Aggregaten im Cytoplasma schließen lässt (Abb. 3.10). Der gleiche Effekt trat auch nach Mutation des Kernimportsignals im viralen M25 ORF auf (Abb. 3.14). Zwischen diesen beiden Effekten der verstärkten Zellabrundung und der größeren Menge an M25-Aggregaten im Cytoplasma könnte insofern ein Zusammenhang bestehen, als dass eine größere Menge an cytoplasmatischen M25-Proteinen auch eine stärkere Abrundung der Zellen verursacht. Die Frage, ob die Menge der durch die unterschiedlichen Retroviren und MCMV-Mutanten synthetisierten Proteine die Stärke der Zellabrundung beeinflusst, könnte durch quantitative Immunoblots beantwortet werden. Auch durch eine Auftrennung der retroviral transduzierten und infizierten Zellen in cytoplasmatische und nukleäre Fraktionen und anschließende Immunoblots würde eine genauere Unterscheidung zwischen der Menge an cytoplasmatischen und nukleären M25-Proteinen ermöglicht werden.

Die einschneidenden Veränderungen der Zellmorphologie durch M25-Proteine könnten durch eine cytoplasmatische Interaktion von M25-Proteinen mit Komponenten des Cytoskeletts verursacht werden. In diesem Fall wäre eine nukleäre Lokalisation der M25-Proteine zur Auslösung der Zellabrundung nicht erforderlich. Obwohl durch Immunfluoreszenz-Untersuchungen eine hauptsächlich nukleäre Lokalisation von M25-Proteinen während der MCMV-Infektion detektiert wurde, könnte durchaus ein kleiner Teil der Proteine im Cytoplasma lokalisiert sein und dort die Modifikation der Zellmorphologie induzieren. Die limitierte Sensitivität der angewandten Methoden zur Detektion der subzellulären Lokalisation lässt diese Möglichkeit offen.

Eine weitere Hypothese ist, dass die Lokalisation der M25-Proteine nicht für die Induktion der Zellabrundung von Bedeutung ist. So könnten M25-Proteine mit zellulären Faktoren, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, interagieren, die sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern vorhanden sind.

Da das Kernimportsignal nicht zur Initiation der Zellabrundung und -verkleinerung in infizierten Zellen notwendig ist, bleibt die Frage offen, wozu M25-Proteine in den Zellkern transportiert werden. Die ab Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Vorgänge, die durch M25-Proteine im Zellkern ausgelöst werden, weisen darauf hin, dass der Transport der M25-Proteine in den Zellkern für weitere Funktionen der M25-Proteine von Bedeutung ist.

4.3.3 Eine MCMV-Infektion zerstört die Fokalkontakte infizierter Zellen

Die Abrundung MCMV-infizierter Zellen geht mit einer Reorganisation des Cytoskeletts einher. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die Bereiche der Zelle, die eine Anheftung an das Substrat vermitteln. In diesen sogenannten Fokalkontakten sind zahlreiche Proteine lokalisiert, die an der Signalvermittlung von der Plasmamembran zum Aktin-Cytoskelett beteiligt sind (vgl. Abschnitt 1.2.2).

Die Zerstörung der Fokalkontakte wurde bereits in HCMV-infizierten Zellen untersucht [Stanton et al., 2007]. Hierbei wurde unter anderem gezeigt, dass die Expression des Fokalkontakt-Proteins Paxillin in HCMV-infizierten Zellen vermindert wird und sich die Lokalisation des Proteins in der infizierten Zelle verändert (vgl. 1.2.4). Während Paxillin in nicht infizierten Zellen deutlich an den Fokalkontakten konzentriert vorliegt, bewirkt eine Infektion mit HCMV eine Verteilung des Paxillins innerhalb des Cytoplasmas. Auch die Expression anderer Fokalkontakt-assoziiierter Proteine, wie zum Beispiel α -Actinin, Connexin 43 und Hic-5 wird durch eine HCMV-Infektion vermindert.

Entsprechend wurde der Einfluss einer MCMV-Infektion auf die subzelluläre Verteilung des Paxillins in dieser Arbeit untersucht. Während in nicht-infizierten Zellen Paxillin deutlich in den Fokalkontakten lokalisiert war, verursachte eine MCMV-Infektion den Abbau der Fokalkontakte sowie eine zunehmende cytoplasmatische Verteilung des Paxillins im Verlauf einer Infektion (Abb. 3.18). Dies entspricht den Vorgängen, die während einer HCMV-Infektion beschrieben wurden.

Für eine Vielzahl von Viren wurde gezeigt, dass sie Veränderungen im Cytoskelett der Wirtszelle verursachen (vgl. Abschnitt 1.2.3). Für einige Viren wurde gezeigt, dass virale Proteine mit Komponenten der Rho GTPase-Familie interagieren, die als Schlüsselfaktoren der Regulation des Aktincytoskeletts fungieren. So interagiert das von Vaccinia Virus (VV) kodierte F11L-Protein mit RhoA und induziert durch dessen Inaktivierung eine Reorganisation des Cytoskeletts [Valderrama et al., 2006]. Das Pseudorabies Virus (PRV)-kodierte US3-Protein verursacht durch die Phosphorylierung der p21-aktivierten Kinasen 1 und 2 (PAK 1 und PAK2) den Abbau von Aktin-Stressfasern sowie die Ausbildung von Zellfortsätzen [Van Minnebruggen et al., 2003]. Generell ermöglicht eine Veränderung von Komponenten des Cytoskeletts den Viruspartikeln den Eintritt in die Zelle, sowie einen Transport der viralen Partikel innerhalb des Cytoplasmas. Das engmaschige Netzwerk von Aktinfilamenten im Zellkortex ist zu überwinden und Aktinfilamente sowie Mikrotubuli werden zum gerichteten Transport von Viruspartikeln verwendet [Radtko et al., 2006].

Stanton et al. [2007] beschreiben in ihrer Arbeit, dass der durch den Eintritt der HCMV-Partikel verursachte Abbau der Aktinstressfasern einen Abbau der Fokalkontakte zur Folge haben könnte. Wäre dies der Fall, müsste auch in den Zellen, die mit MCMV-GFP

Δ M25 infiziert werden, ein Abbau der Fokalkontakte zu beobachten sein. Die Fokalkontakte blieben jedoch nach Infektion mit MCMV-GFP Δ M25 intakt und auch das Aktincytoskelett scheint keine Veränderung nach Infektion mit MCMV-GFP Δ M25 zu zeigen [Sengstake, 2009]. Es ist also auszuschließen, dass der Abbau der Fokalkontakte allein durch den Eintritt von MCMV in die Zelle verursacht wird. Zudem scheint der Abbau von Aktinstressfasern und Fokalkontakten nicht zwingend für eine erfolgreiche Replikation von MCMV notwendig zu sein.

Die alleinige Expression der M25-Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 war ausreichend, um eine Veränderung im Aktincytoskelett transduzierter Zellen zu verursachen (vgl. Abschnitt 4.3.1). Es wurde daher untersucht, ob die Expression dieser M25-Proteine auch einen Abbau der Fokalkontakte verursacht, wie er während der MCMV-Infektion beobachtet wurde. In den Zellen, die das M25-ATG6-Protein exprimierten, konnten zwar deutliche Verkleinerungen der Zellgrößen beobachtet werden, während des gesamten Untersuchungszeitraumes nach der Transduktion blieb Paxillin jedoch deutlich an den Fokalkontakten lokalisiert (Abb. 3.19).

Die M25-induzierten Veränderungen der Zellmorphologie führen demnach nicht zwangsläufig zu einem Abbau der Fokalkontakte. Der während einer MCMV-Infektion beobachtete Abbau der Fokalkontakte wäre demzufolge ein gemeinsamer Effekt von M25-Proteinen und weiteren viralen Proteinen. Um eine Interaktion von M25-Proteinen mit anderen MCMV-Proteinen nachzuweisen, könnten Immunpräzipitations-Experimente mit M25-Proteinen durchgeführt werden, die mit einer Epitop-Markierung zur Protein-Aufreinigung versehen wurden.

4.3.4 Möglicher Mechanismus zur Induktion der Zellabrundung durch M25-Proteine

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die alleinige Expression der M25-Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 ausreicht, eine Veränderung der Zellmorphologie zu verursachen (Abschnitt 4.3.1). Die intrazelluläre Lokalisation der M25-Proteine scheint hierbei keine Rolle zu spielen, da sowohl die hauptsächlich nukleär lokalisierten M25-ATG2- und M25-ATG6-Proteine, als auch das M25-ATG6 NLSmut-Protein, welches hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiert war, eine Verkleinerung der Zellen induzierte (Abschnitt 4.3.2). Dies wirft die Frage auf, welcher Mechanismus zu der durch M25-Proteine ausgelösten Zellabrundung führt.

Eine Möglichkeit der Funktionsweise von M25-Proteinen liegt in der Interaktion mit Komponenten des RhoA-Pathways, die sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma vorliegen (vgl. Abschnitt 1.2.1). So ist zum Beispiel für die p21-aktivierten Kinasen (PAK) gezeigt worden, dass PAK1 in Fokalkontakten, der Plasmamembran sowie im Nukleus lokalisiert

sein kann [Singh et al., 2005], während PAK2 hauptsächlich am Golgi-Apparat lokalisiert ist [Huang et al., 2003].

Weitere Hinweise auf den möglichen von M25-Proteinen ausgelösten Mechanismus ergeben sich aus der Kolo-kalisation von M25-Proteinen mit ND10 *domains* im Zellkern, die in Abschnitt 4.4.1 diskutiert wird. Da nukleäre ND10 *domains* als Orte der Regulation der Transkription bezeichnet werden und viele Transkriptionsfaktoren in diesen Bereichen lokalisieren [Zhong et al., 2000a], kann es möglich sein, dass M25-Proteine hier mit Transkriptionsfaktoren interagieren (vgl. Abschnitt 1.6.1). Ein Kandidat hierfür ist der Serum *response factor* (SRF), der als Hauptregulator des Aktincytoskeletts beschrieben wird [Miano et al., 2007]. SRF kontrolliert die Expression von Cytoskelett-Proteinen, wie Vinculin und verschiedener Aktin-Arten [Moiseyeva et al., 1993; Frederickson et al., 1989; Mack and Owens, 1999]. SRF interagiert mit dem PML-Protein und ist in ND10 *domains* lokalisiert [Matsuzaki et al., 2003a]. Weiterhin wurde gezeigt, dass SRF durch SUMO-1 modifiziert wird [Matsuzaki et al., 2003b]. Da die Interaktion mit SUMOylierten Proteinen offenbar für die Kolo-kalisation von M25-Proteinen mit ND10 *domains* von Bedeutung ist (vgl. Abschnitt 4.4.3), könnte dies ein Hinweis auf eine mögliche Interaktion von M25-Proteinen mit diesem Transkriptionsfaktor sein.

Um die Hypothese zu untersuchen, dass M25-Proteine über eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor SRF oder Kofaktoren die Organisation des Cytoskeletts beeinflussen, sind weitere Kolo-kalisations- und Interaktionsstudien durchzuführen.

4.4 Eigenschaften der M25-Proteine im Zellkern

Sowohl die MCMV-exprimierten als auch die retroviral exprimierten M25-Proteine zeigen eine hauptsächlich nukleäre Lokalisation. Die nukleären M25-Proteine wurden in Hinblick auf ihre Kolo-kalisation mit zellulären Strukturen, sowie auf die Funktionen, die M25-Proteine im Zellkern ausüben könnten, untersucht.

4.4.1 M25-Proteine kolo-kalisieren mit nukleären ND10 *domains*

In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden HA-markierte M25-Proteine als ring- oder kreisförmige Aggregate heterogener Größe nachgewiesen (Abb. 3.7). Durch konfokale Mikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass diese Aggregate eine kugelartige Struktur aufweisen, in deren Inneren sich keine M25-Proteine befinden (Abb. 3.8). Diese Struktur deutet darauf hin, dass M25-Proteine sich um einen Kern aus anderen zellulären, oder aber im Falle einer MCMV-Infektion, auch aus viralen Komponenten anlagern. Nach der retroviralen Transduktion waren die kugelförmigen M25-Strukturen größer als nach einer MCMV-Infektion, was auf eine stärkere Expression der Proteine durch den retroviralen

Promotor hinweist. Es wäre auch möglich, dass die Abwesenheit der MCMV-Infektion die Bildung der M25-Aggregate beeinflusst. So könnte während einer MCMV-Infektion die Transkription des M25 ORFs und die Bildung der M25-Aggregate durch zelluläre Abwehrmechanismen vermindert werden. Auch die Anwesenheit weiterer viraler Proteine im Falle der MCMV-Infektion könnte die Struktur der M25-Aggregate beeinflussen.

Die Morphologie der detektierten M25-Aggregate und deren hauptsächlich nukleäre Lokalisation deutete auf einen möglichen Zusammenhang mit nukleären ND10 *domains* hin. Wie von Boisvert et al. [2000] gezeigt, weisen auch ND10 *domains* eine ring- oder kugelförmige Struktur im Zellkern auf, die auf einer schichtweisen Zusammenlagerung von Chromatin und ND10-assoziierten Komponenten um einen Proteinkern herum beruht.

Durch die gleichzeitige Markierung von M25HA- und PML-Proteinen mit Antikörpern war eine Kolokalisation der M25-Proteine mit ND10 *domains* in retroviral transduzierten Zellen nachzuweisen (Abb. 3.20). Hierbei waren verschiedene Ausprägungen der Kolokalisation zu erkennen. So kam es teilweise zu einer vollständigen Überlagerung der Signale von PML- und M25-Proteinen, teilweise waren auch nur kleine Bereiche der ringförmigen M25-Aggregate mit den PML-Signalen überlagert. Sämtliche detektierbaren PML-Signale waren mit M25-Aggregaten assoziiert. Die Akkumulation der PML-Proteine an den M25-Aggregaten deutet darauf hin, dass die M25-Proteine eine räumliche Reorganisation der ND10 *domains* im Zellkern verursachen.

Die Assoziation der M25-Proteine mit ND10 *domains* konnte auch zu frühen Zeitpunkten der MCMV-Infektion bestätigt werden. Während in retroviral transduzierten Zellen die Kolokalisation zwischen M25-Proteinen und ND10 *domains* deutlich erkennbar war, war diese in MCMV-infizierten Zellen jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt (Abb. 3.26). Auch konnte diese Kolokalisation nur zu frühen Zeitpunkten der Infektion beobachtet werden (bis 5 h p.i.), da es aufgrund der MCMV-Infektion zu einer Auflösung der ND10 *domains* und zu einem Ausschluss der PML-Proteine aus dem Zellkern kommt (vgl. Abschnitt 1.6.2). Diese Auflösung der ND10 *domains* ist auf die Anwesenheit des viralen IE1-Proteins zurückzuführen, welches eine deSUMOylierung der PML-Proteine verursacht und hierdurch die Funktion der PML-Proteine als Gerüst für die ND10 *domains* zerstört [Müller and Dejean, 1999]. Da die ring- und kugelförmigen Strukturen der viralen M25-Proteine auch nach der Auflösung der ND10 *domains* und dem Ausschluss der PML-Proteine aus dem Zellkern erhalten bleiben, ist eine direkte Interaktion von M25-Proteinen mit PML-Proteinen unwahrscheinlich. Experimente mit einer MCMV-Variante, deren Kernimportsignal im M25 ORF mutiert wurde, stützen diese Interpretation. In Zellen, die mit dieser MCMV-Variante infiziert wurden, lokalisieren M25-Proteine überwiegend im Cytoplasma, es ist jedoch keine Kolokalisation zwischen M25-Proteinen und cytoplasmatischen PML-Proteinen zu beobachten (Abb. 3.27).

Es wäre möglich, dass M25-Proteine nur mit SUMOylierten PML-Proteinen interagieren können (siehe Abschnitt 4.4.3). Da die Zerstörung der ND10 *domains* und der Ausschluss der PML-Proteine durch eine deSUMOylierung von PML-Proteinen verursacht wird (siehe Abschnitt 1.6.2), könnte der cytoplasmatische Anteil der PML-Proteine somit auch nicht mehr mit M25-Proteinen interagieren. Hierbei bleibt die Möglichkeit bestehen, dass M25-Proteine mit weiteren Komponenten der ND10 *domains* interagieren, die auch nach der Auflösung der ND10 *domains* im Bereich der M25-Aggregate verbleiben.

Es sind weitere virale Proteine bekannt, die einzeln exprimiert eine Kolo-kalisation mit ND10 *domains* zeigen. In diesem Zusammenhang ist die große Ähnlichkeit der Struktur der M25-Protein-Aggregate zu Strukturen, die HCMV-kodierte UL35-Proteine im Zellkern bilden, auffällig. UL35-Proteine bilden ebenfalls ringförmige Strukturen im Zellkern, die abschnittsweise mit PML-Proteinen kolo-kalisieren [Salsman et al., 2008]. UL35 gehört zur HCMV UL25-Genfamilie [Chee et al., 1990], wobei UL25 das HCMV-Homolog zu M25 darstellt. Eine Deletion des UL25 ORFs im HCMV-Genom führte jedoch, anders als nach Deletion des M25 ORFs im MCMV-Genom, nicht zu einem Ausbleiben des cytopathischen Effekts der Zellabrundung (Daten nicht gezeigt).

Für das UL35-Protein ist bekannt, dass es mittels eines weiteren HCMV-kodierten Proteins, UL82, mit dem ND10 *domain*-assoziierten zellulären Protein hDaxx interagiert [Schierling et al., 2004]. Als Funktion wurde für UL35 eine transaktivierende Funktion auf den *major immediate early* Promotor von HCMV beschrieben [Liu and Biegalke, 2002]. Eine Deletion des UL35 ORFs führte zu einer verminderten Expression viraler *early*-Proteine, sowie zu einer Anhäufung unreifer Viruspartikel in infizierten Zellen [Schierling et al., 2005].

Ob sich aus der Ähnlichkeit der subnukleären Lokalisation und Struktur von M25- und UL35-Proteinen ein möglicher Hinweis auf die Funktion der M25-Proteine ableiten lässt, ist durch weitere Untersuchungen zu klären. Insbesondere die Frage, ob M25-Proteine eine transaktivierende Tätigkeit ausüben, wäre zu untersuchen.

4.4.2 ND10 *domains* werden durch M25-Proteine reorganisiert

Nach retroviraler Expression der M25-Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 zeigte sich eine Veränderung der Anzahl und Form der ND10 *domains* im Zellkern. Die Anzahl der ND10 *domains* verringerte sich in Anwesenheit von M25-Proteinen von durchschnittlich 13 auf sieben bzw. fünf Aggregate. Gleichzeitig zeigten die ND10 *domains* eine Vergrößerung ihrer Strukturen (Abb. 3.21 und 3.22).

Sowohl die Expression von PML-Proteinen als auch die anderer ND10-assoziiierter Proteine, wie Sp100, Sp140 oder Sp110 wird durch Interferone induziert, was darauf hinweist, dass ND10 *domains* eine Rolle in der Interferon-Antwort auf eine virale Infektion spielen

(siehe Kapitel 1.4 und 1.6.1) [Guldner et al., 1992; Bloch et al., 1999]. Um die Situation der Zelle während einer viralen Infektion zu simulieren, wurden die zu untersuchenden Fibroblasten durch die Gabe von IFN β in einen „antiviralen Status“ versetzt. Durch die Anwesenheit der M25-Proteine ließ sich auch nach IFN β -Gabe im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen eine deutliche Verringerung der Anzahl an ND10 *domains* im Zellkern beobachten.

Der Effekt der Verminderung der Anzahl der ND10 *domains* durch virale Proteine wurde auch bei der Untersuchung anderer Herpesvirus-kodierter Proteine beobachtet [Salsman et al., 2008]. Nach Expression der durch das Epstein-Barr-Virus (EBV) kodierten Proteine BDLF1, EBNA 3B und BRLF1 wurde die Anzahl der ND10 *domains* in einem ähnlichen Maße reduziert, wie nach der Expression von M25-Proteinen. Auch HSV-1 und HCMV kodieren für Proteine, welche die Anzahl der ND10 *domains* verringern. Für HCMV wurde dies für eine ganze Reihe an Proteinen gezeigt, wie z.B. UL76, US25 und UL68 [Salsman et al., 2008]. All diese Proteine verringern zwar die Anzahl der ND10 *domains* pro Zellkern, nicht jedoch deren Größe und Form.

Der Mechanismus der Reduktion der Anzahl der ND10 *domains*, bzw. der Zerstörung dieser Strukturen wurde bisher z.B. für das CMV-Protein IE1 oder das EBV-Protein BZLF1 beschrieben. In beiden Fällen werden die PML-Proteine der ND10 *domains* deSUMOyliert, was eine Auflösung der ND10 *domains* zur Folge hat (vgl. Abschnitt 1.5 und 1.6.2) [Adamson and Kenney, 2001; Müller and Dejean, 1999].

Im Unterschied zu der IE1-induzierten Auflösung der ND10 *domains* in MCMV-infizierten Zellen, wurde bei M25-Expression in retroviral transduzierten Zellen nur eine Verringerung der Anzahl der ND10 *domains* beobachtet. Die ND10 *domains* blieben aber weiterhin als klar abgegrenzte Strukturen erhalten. Ein weiterer Unterschied im Effekt von M25-Proteinen auf ND10 *domains* im Vergleich zu den oben genannten Proteinen war, dass sich die Strukturen der ND10 *domains* bei M25-Expression sogar noch vergrößerten. Aufgrund der Kolo-kalisation von M25-Proteinen mit PML-Proteinen (Abb 3.20) und der abnehmenden Anzahl der ND10 *domains* bei gleichzeitiger Größenzunahme der detektierten Strukturen ist zu vermuten, dass es aufgrund der M25-Expression zu einer Reorganisation der ND10 *domains* kommt, wobei ND10-assoziierte Proteine an M25-Aggregaten akkumulieren.

Dass für eine Reorganisation der ND10 *domains* die nukleäre Lokalisation der M25-Proteine essentiell ist, zeigte eine Wiederholung des oben beschriebenen Versuchs mit einer M25-Variante mit mutiertem Kernimportsignal (pSF ATG6 NLSmut). Anzahl und Form der ND10 *domains* entsprachen der von ND10 *domains* in nicht transduzierten Zellen (Abb. 3.23 und 3.24). Hierdurch konnte belegt werden, dass es sich bei der Reorganisation der ND10 *domains* um einen Effekt handelt, der spezifisch durch nukleär lokalisierte M25-Proteine induziert wird.

Die Fähigkeit nukleärer M25-Proteine zur Reorganisation von ND10 *domains* wirft zwei Fragen auf. Zunächst wäre zu klären, welche Bedeutung dieser Funktion im Kontext einer physiologischen MCMV-Infektion zukommt, da belegt ist, dass bereits zu frühen Zeitpunkten der Infektion ein Abbau der ND10 *domains* durch IE1 eingeleitet wird (siehe Abschnitt 1.6.2). Hier würde möglicherweise eine Untersuchung der ND10 *domains* in MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen einen Hinweis für die Bedeutung dieser Funktion liefern. Es wäre möglich, dass die von M25-Proteinen induzierte Reorganisation der ND10 *domains* eine Voraussetzung für den IE1-vermittelten Abbau der ND10 *domains* darstellt. Sofern der Abbau der ND10 *domains* in MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen inhibiert oder zumindest verzögert würde, könnte dies die Funktion der Reorganisation der ND10 *domains* durch M25-Proteine erklären.

Ferner wäre die Frage nach dem Mechanismus zu beantworten, mit dem M25-Proteine die Reorganisation der ND10 *domains* bewirken. Diese Fragestellungen lassen sich möglicherweise durch Kollokalisationsstudien von M25-Proteinen mit weiteren ND10-assoziierten Proteinen beantworten. Auch Interaktionsstudien könnten zur Klärung dieser Fragen beitragen.

4.4.3 SUMO-vermittelte Reorganisation der ND10 *domains* durch M25-Proteine

Zur Bildung der nukleären ND10 *domains* ist eine Modifizierung von PML-Proteinen durch SUMO-1 erforderlich [Zhong et al., 2000a]. Eine große Anzahl ND10 *domain*-assoziiierter Proteine, wie SP100, Daxx und p53 weisen ebenfalls eine SUMO-Modifikation auf [Sternsdorf et al., 1999; Jang et al., 2002; Kwek et al., 2001]. Die Tatsache, dass M25-Proteine mit den nukleären ND10 *domains* koloalisieren und auch in der Lage sind, diese zu modifizieren, weist auf die Möglichkeit hin, dass es auch zu einer SUMO-Modifizierung der M25-Proteine kommen könnte (siehe Kapitel 1.5).

Während in der M25-Aminosäuresequenz jedoch kein Motiv für die kovalente SUMOylierung identifiziert werden konnte, wurden vier potentielle SUMO interacting motifs (SIMs) gefunden, die eine nicht-kovalente Interaktion mit SUMO vermitteln könnten (Abb. 3.28). Die Frage, wie spezifisch diese SIM-vermittelten Interaktionen mit SUMOylierten Proteinen sind, ist derzeit nicht ausreichend geklärt. Es ist möglich, dass die Fähigkeit, spezifisch eine der drei Isoformen (SUMO-1 bis SUMO-3) von SUMO zu binden, auf der Anordnung der hydrophoben und sauren Aminosäurereste innerhalb des SIM beruht [Chupreta et al., 2005]. Auch kann die Umgebung des SIM für eine Interaktion mit einer spezifischen SUMO-Isoform bestimmend sein (siehe Abschnitt 1.5.2).

Es wurden bereits Proteine identifiziert, die über eine nicht-kovalente SUMO-Interaktion mit Komponenten der ND10 *domains* interagieren. Zum Beispiel interagiert das zellu-

läre Enzym Thymin DNA Glycosylase (TDG) mit dem PML-Protein in ND10 *domains* über ein SIM [Takahashi et al., 2005]. Auch weitere ND10-assoziierte Proteine interagieren nicht-kovalent mit SUMO [Hecker et al., 2006; Minty et al., 2000].

Durch eine gezielte Mutation der potentiellen SIM im ORF von M25-ATG6 (Abb. 3.29) wurde daher untersucht, ob die Kolokalisation mit zellulären ND10 *domains* durch eine nicht-kovalente Interaktion mit SUMO zustande kommt. Da das in Abb. 3.28 dargestellte SIM 1 nicht innerhalb der Sequenz des M25-ATG6-Proteins liegt, es jedoch zwischen der nukleären Lokalisation von M25-ATG2 und M25-ATG6, sowie in der Kolokalisation zu ND10 *domains* keinen Unterschied gab, wurde auf eine Untersuchung des SIM 1 verzichtet.

Die Mutation der potentiellen SIMs 2 und 4 verursachte keine Veränderung in der Kolokalisation von M25-ATG6-Proteinen zu ND10 *domains* in retroviral transduzierten Zellen (Abb. 3.30). Die zuvor nachgewiesene Verringerung der Anzahl der ND10 *domains* sowie die Größenänderung dieser Kompartimente war auch in M25-ATG6 SIM2mut- und M25-ATG6 SIM4mut-exprimierenden Zellen zu beobachten. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde geschlossen, dass die potentiellen SIMs 2 und 4 nicht für die Kolokalisation mit ND10 *domains* benötigt werden. Ob diese potentiellen SIMs dennoch nicht-kovalent SUMO binden können, bedarf weiterer Untersuchungen.

Nach Mutation des potentiellen SIM3 kam es hingegen zu einer veränderten Situation in den transduzierten Zellen. Die M25-Proteine bildeten nach wie vor kreis- bzw. kugelförmige Strukturen, jedoch blieb eine Kolokalisation mit nukleären PML-Proteinen aus. Auch die zuvor beobachtete Modifizierung der ND10 *domains* war in diesen Zellen nicht feststellbar. Die ND10 *domains* glichen in ihrer Anzahl und Größe denen in nicht transduzierten Zellen (Abb. 3.30).

Das Vorhandensein eines funktionellen SIM in M25-Proteinen impliziert die Möglichkeit, dass M25-Proteine mit SUMOylierten Proteinen im Zellkern interagieren, und so die Modifizierung der ND10 *domains* verursachen. Es ist zudem möglich, dass es grundsätzlich eine spezifische Interaktion von M25-Proteinen mit einem ND10-assoziierten Protein gibt, die zusätzlich durch die Interaktion mit SUMO stabilisiert wird (vgl. Abb. 1.10A). Durch die Mutation des SIM würde in einem solchen Fall die spezifische Interaktion unterbrochen werden. Um zu zeigen, dass das in der M25-Sequenz identifizierte SIM tatsächlich eine Interaktion mit SUMO oder SUMOylierten Proteinen vermittelt, sind weitere Untersuchungen notwendig.

4.4.4 Mögliche Interferon-antagonistische Funktion von M25-Proteinen

Viele der ND10-assoziierten Proteine werden in ihrer Expression durch Interferone verstärkt [Regad and Chelbi-Alix, 2001]. Auf der anderen Seite haben viele Viren Mechanismen entwickelt, ND10-Strukturen aufzulösen [Everett, 2001]. Beide Mechanismen weisen auf eine bedeutende Funktion der ND10 *domains* in der intrinsischen Immunität gegen die virale Infektion hin.

Nach Deletion des ND10-Proteins PML wurde eine erhöhte *immediate early*-Protein-Expression bei einer Infektion mit HCMV beobachtet. Auch die virale Replikation war in den PML-negativen Zellen erhöht [Tavalai et al., 2006]. Obwohl zelluläre ND10 *domains* als Initiations-Ort der viralen Replikation betrachtet werden [Maul et al., 1996], scheint ein Fehlen des PML-Proteins einen positiven Effekt auf die virale Replikation von HCMV zu haben (siehe Abschnitt 1.6.2) [Tavalai et al., 2006].

Es ist daher durchaus möglich, dass eine viral vermittelte Reorganisation von ND10 *domains* dem Zweck dient, eine Interferon-induzierte antivirale Funktion in infizierten Zellen zu vermindern. Die Nähe der M25-Proteine zu den zellulären ND10 *domains* (Abb. 3.20 und 3.26), sowie die durch M25-Proteine induzierten Veränderungen dieser Strukturen (Abb. 3.21) lassen die Vermutung zu, dass M25-Proteine zu einer Toleranz von MCMV gegen zelluläre, Interferon-induzierte Abwehrmechanismen beitragen (siehe Abschnitt 1.4.2). Aus diesem Grund wurde die Replikationsfähigkeit des Wildtyp-Virus MCMV-GFP mit der einer M25-Deletionsmutante MCMV-GFP Δ M25 in Anwesenheit von IFN β verglichen. Welchen Effekt die Deletion eines MCMV-Proteins auf die Replikation in Anwesenheit von TypI- und TypII-Interferonen haben kann, wurde durch Zimmermann et al. [2005] gezeigt. Das MCMV-Protein M27 vermittelt eine moderate Toleranz gegen TypI-Interferone, jedoch eine hohe Toleranz gegen IFN γ . Das M27-Protein greift in den Interferon-Signalweg ein und blockiert so die transkriptionelle Aktivierung INF-induzierbarer Gene (siehe Abschnitt 1.4.2).

Da eine MCMV-Infektion in Fibroblasten in Zellkultur nur eine geringe Menge an Typ-I-Interferonen induziert [Zimmermann et al., 2005; Le et al., 2008], wurden die zu infizierenden MEF 24 h vor Infektion durch Inkubation mit IFN β in einen „antiviralen Zustand“ versetzt, indem die Typ-I Interferon regulierten Prozesse in der Zelle aktiviert wurden. Am Tag 2 nach Infektion führte die Gabe von IFN β zu einer Reduktion der Replikation von MCMV-GFP (Abb. 3.25 und Tab. 3.2). Dieser Effekt ist vergleichbar mit den bereits beschriebenen Auswirkungen von IFN α auf die Virusreplikation [Zimmermann et al., 2005]. Zu späteren Zeitpunkten wurde dagegen nur eine geringe Reduktion der viralen Titer durch IFN β -Gabe beobachtet. Da IFN β letztmalig zum Zeitpunkt der Infektion zugegeben wurde, kann der zu späteren Zeitpunkten geringere Effekt auf die Virusreplikation

möglicherweise auf eine Verdünnung des IFN β bzw. auf eine Inaktivierung durch virale Proteine zurückgeführt werden.

Die Replikation von MCMV-GFP Δ M25 wurde durch IFN β -Gabe an Tag 1 nach Infektion stark reduziert. Diese besonders starke Reduktion des Virustiters wurde an folgenden Messzeitpunkten jedoch nicht mehr beobachtet. Ab Tag 3 nach Infektion war kein merklicher Einfluss von IFN β auf die Virusreplikation mehr nachzuweisen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich nicht mit Sicherheit schließen, ob das Fehlen von M25-Proteinen die beobachtete starke Sensitivität auf IFN β zu frühen Zeitpunkten verursacht.

Da in den MCMV-GFP Δ M25-infizierten Zellen, genau wie in den MCMV-GFP-infizierten Zellen die Interferon-Signalvermittlung durch andere MCMV-kodierte Faktoren, wie z.B. M27, unterbrochen wird, ließe sich hiermit der insgesamt geringe Einfluss von IFN β auf die Replikation erklären. Durch die Anwesenheit dieser Interferon-antagonistischen Faktoren könnte das Fehlen der M25-Proteine kompensiert worden sein. Insbesondere die Tatsache, dass schon zwei Tage nach Infektion kein wesentlicher Unterschied zwischen den Virustitern von MCMV-GFP und MCMV-GFP Δ M25 in Anwesenheit von IFN β mehr gemessen werden konnte, lässt bezweifeln, ob M25-Proteine eine Toleranz gegen IFN β vermitteln.

Ob die Fähigkeit von M25-Proteinen, ND10 *domains* zu reorganisieren, in einem Zusammenhang zur Toleranz von MCMV gegen Interferone steht, lässt sich aufgrund der bisherigen Ergebnisse nicht eindeutig zeigen. Falls M25-Proteine zu sehr frühen Zeitpunkten der Infektion, z.B. durch Reorganisation der ND10 *domains*, die Interferon-Antwort der Zelle behindern, könnte dies dem Virus ermöglichen, die Translation des viralen Genoms und die *early*-Proteinsynthese zu initiieren. Dies würde für das MCMV-GFP-Virus einen „Startvorteil“ bedeuten, wodurch die für das MCMV-GFP-Virus beobachtete höhere Replikation in Anwesenheit von IFN β , sowie die Reduktion des viralen Titers von MCMV-GFP Δ M25 durch IFN β zu frühen Zeitpunkten der Infektion erklärbar wäre.

Für eine abschließende Bewertung müsste die Replikation der beiden Virusvarianten unter längerer Gabe von IFN β untersucht werden. Zudem muss das Experiment auch in Anwesenheit von IFN γ durchgeführt werden, um den Effekt von TypII-Interferonen auf die Replikation von MCMV-GFP und MCMV-GFP Δ M25 zu bestimmen. Weiterhin könnten Virus-Mutanten untersucht werden, in denen neben bekannten Interferon-antagonistischen Genen, wie z.B. das M27-Gen, auch der M25 ORF deletiert wurde. Falls M25-Proteine tatsächlich die Entstehung eines Interferon-induzierten antiviralen Status in infizierten Zellen erschweren, könnte hierdurch auch die generell leicht verminderte Virusreplikation nach Deletion des M25 ORFs erklärt werden (Abb. 3.2).

4.5 Mögliche Funktionen der M25-Proteine während der MCMV-Infektion

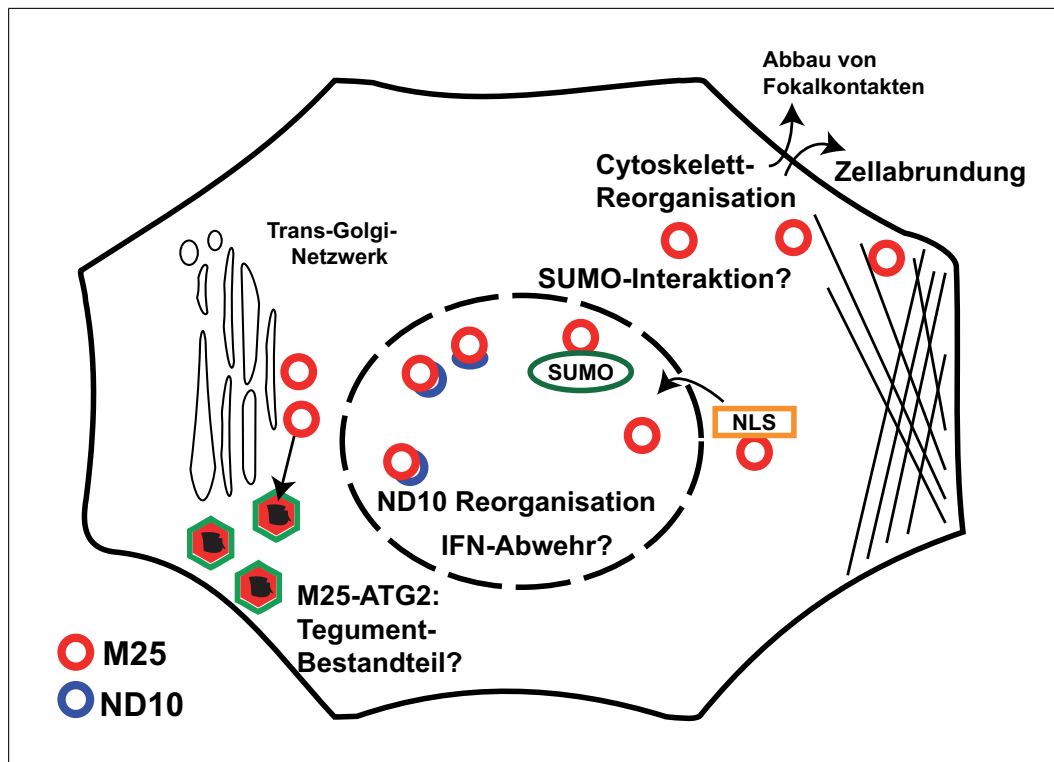


Abbildung 4.1 Mögliche Funktionen und Eigenschaften der M25-Proteine. In dieser Arbeit wurden für M25-Proteine verschiedene Eigenschaften nachgewiesen, die auf mehrere Funktionen während der MCMV-Infektion hinweisen: Induktion der Zellabrundung, Reorganisation der nukleären ND10 *domains*, Vermittlung von Toleranz gegenüber Interferonen, Interaktion mit SUMO. Weiterhin wird in der Literatur das 130 kDa-Protein M25-ATG2 als Bestandteil des Teguments von MCMV beschrieben.

M25-Proteine induzieren während einer MCMV-Infektion einen cytopathischen Effekt, der mit der Abrundung infizierter Zellen einhergeht [Sengstake, 2009]. Neben diesem primär hervorstechenden Effekt wurden in dieser Arbeit weitere Funktionen identifiziert, an denen M25-Proteine beteiligt sind. Diese Erkenntnisse wurden sowohl durch die Betrachtung von M25-Proteinen während einer MCMV-Infektion, als auch durch die retrovirale Expression der einzelnen Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 gewonnen. Ein Überblick über die möglichen Funktionen und Eigenschaften der M25-Proteine ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Reorganisation des Cytoskeletts und die damit einhergehende Induktion der Zellabrundung durch beide M25-Proteine unabhängig von einer viralen Infektion ausgelöst werden. Hierbei ist die subzelluläre Lokalisation der

M25-Proteine offenbar nicht von Bedeutung. Als Mechanismus wären z.B. Interaktionen von M25-Proteinen mit Transkriptionsfaktoren oder mit Komponenten der Rho GTPase-Signalwege im Zellkern oder im Cytoplasma vorstellbar.

Während einer MCMV-Infektion erfolgt ein Abbau von Fokalkontakten. Durch alleinige Expression von M25-Proteinen bleibt dieser Effekt aus, so dass hierfür vermutlich weitere virale Proteine im Zusammenhang mit der M25-induzierten Zellabrundung benötigt werden. M25-Proteinen kommt demnach hierbei eine Rolle zu, die in weiteren Versuchen zu präzisieren wäre.

Die M25-Proteine lokalisieren überwiegend im Zellkern infizierter und transduzierter Zellen. Hierfür ist ein Kernimportsignal in der M25-Aminosäuresequenz verantwortlich. Zu späteren Zeitpunkten werden gemäß Wu et al. [1999] cytoplasmatisch lokalisierte M25-Proteine in das Tegument neu entstehender Viruspartikel eingebaut, wobei es sich vermutlich um M25-ATG2-Proteine handelt, die über die N-terminale Proteindomäne in das „Assembly Compartment“ geleitet werden.

Im Zellkern bilden M25-Proteine kugelartige Strukturen, die mit zellulären ND10 *domains* kolokalisieren. Hierbei kommt es, insbesondere im Falle der retroviralen Expression, zu einer Reorganisation der nukleären ND10 *domains*. Dieser Vorgang könnte während der MCMV-Infektion der Unterstützung des IE1-vermittelten Abbaus der ND10 *domains* dienen, oder aber auch die antivirale Funktion der Interferon-induzierbaren ND10 *domains* vermindern. Die Reorganisation der ND10 *domains* findet nur in Anwesenheit eines intakten SUMO *interacting motifs* statt. Die erzielten Ergebnisse deuten daraufhin, dass M25-Proteine mit SUMOylierten Proteinen im Zellkern interagieren.

Die Ausbreitung der MCMV-Infektion *in vitro* wird durch die Expression der M25-Proteine begünstigt. Hierfür könnten die M25-induzierten Veränderungen des Cytoskeletts eine Rolle spielen. Denkbar wäre auch, dass M25-Proteine eine erhöhte Toleranz gegenüber der antiviralen Interferon-Antwort der Zelle vermitteln, und so eine schnellere Replikation des Virus ermöglichen.

Für die Funktion der M25-Proteine während einer MCMV-Infektion scheint der möglichen Interaktion mit ND10-assoziierten Proteinen im Zellkern, neben der Induktion der Zellabrundung, eine zentrale Bedeutung zuzukommen. Es ist durchaus möglich, dass diese Vorgänge miteinander verknüpft sind. Ausgehend von dieser Hypothese wäre es demnach das primäre Ziel weiterführender Arbeiten, die identifizierten Eigenschaften und Funktionen von M25-Proteinen ggf. miteinander in Verbindung zu bringen. Ein erster Schritt hierzu wäre die Identifizierung zellulärer Interaktionspartner der M25-Proteine.

Literaturverzeichnis

- Abate, D. A., S. Watanabe, and E. S. Mocarski. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol*, 78(20):10995–11006, 2004.
- Adamson, A. L. and S. Kenney. Epstein-barr virus immediate-early protein BZLF1 is SUMO-1 modified and disrupts promyelocytic leukemia bodies. *J Virol*, 75(5):2388–2399, 2001.
- Ahn, J. H. and G. S. Hayward. Disruption of PML-associated nuclear bodies by IE1 correlates with efficient early stages of viral gene expression and DNA replication in human cytomegalovirus infection. *Virology*, 274(1):39–55, 2000.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH, 2004.
- Albrecht, T., T. Cavallo, N. L. Cole, and K. Graves. Cytomegalovirus: development and progression of cytopathic effects in human cell culture. *Lab Invest*, 42(1):1–7, 1980.
- Albrecht, T., D. J. Speelman, and O. S. Steinsland. Similarities between cytomegalovirus-induced cell rounding and contraction of smooth muscle cells. *Life Sci*, 32(19):2273–2278, 1983.
- Alkuraya, F. S., I. Saadi, J. J. Lund, A. Turbe-Doan, C. C. Morton, and R. L. Maas. SUMO1 haploinsufficiency leads to cleft lip and palate. *Science*, 313(5794):1751, 2006.
- Antman, K. and Y. Chang. Kaposi’s sarcoma. *N Engl J Med*, 342(14):1027–1038, 2000.
- Arakawa, Y., J. V. Cordeiro, and M. Way. F11L-mediated inhibition of RhoA-mDia signaling stimulates microtubule dynamics during vaccinia virus infection. *Cell Host Microbe*, 1(3):213–226, 2007.
- Ascoli, C. A. and G. G. Maul. Identification of a novel nuclear domain. *J Cell Biol*, 112(5):785–795, 1991.

- Baba, D., N. Maita, J.-G. Jee, Y. Uchimura, H. Saitoh, K. Sugasawa, F. Hanaoka, H. Tochio, H. Hiroaki, and M. Shirakawa. Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature*, 435(7044):979–982, 2005.
- Balthesen, M., M. Messerle, and M. J. Reddehase. Lungs are a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. *J Virol*, 67(9):5360–5366, 1993.
- Bayer, P., A. Arndt, S. Metzger, R. Mahajan, F. Melchior, R. Jaenicke, and J. Becker. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol*, 280(2):275–286, 1998.
- Bloch, D. B., J. D. Chiche, D. Orth, S. M. de la Monte, A. Rosenzweig, and K. D. Bloch. Structural and functional heterogeneity of nuclear bodies. *Mol Cell Biol*, 19(6):4423–4430, 1999.
- Boggio, R. and S. Chiocca. Viruses and sumoylation: recent highlights. *Curr Opin Microbiol*, 9(4):430–436, 2006.
- Boisvert, F. M., M. J. Hendzel, and D. P. Bazett-Jones. Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J Cell Biol*, 148(2):283–292, 2000.
- Borden, K. L. RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol*, 295(5):1103–1112, 2000.
- Boyle, K. A., R. L. Pietropaolo, and T. Compton. Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway. *Mol Cell Biol*, 19(5):3607–3613, 1999.
- Britt, W. Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, 325:417–470, 2008.
- Britt, W. J. Cytomegalovirus. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, editors, *Fields Virology*, volume 2, chapter 77, pp. 2493–2523. Lippincott Williams & Wilkins, 3rd edition, 1996.
- Browne, E. P. and T. Shenk. Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(20):11439–11444, 2003.
- Browne, E. P., B. Wing, D. Coleman, and T. Shenk. Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J Virol*, 75(24):12319–12330, 2001.

-
- Burridge, K., K. Fath, T. Kelly, G. Nuckolls, and C. Turner. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*, 4:487–525, 1988.
- Butcher, E. C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, 67(6):1033–1036, 1991.
- Cajal, S. Un sencillo método de coloración selectiva del retículo protoplásmico y sus efectos en los diversos órganos nerviosos de vertebrados e invertebrados. *Tra Lab Invest Biol*, 2:129–221, 1903.
- Chapman, T. L. and P. J. Bjorkman. Characterization of a murine cytomegalovirus class I major histocompatibility complex (MHC) homolog: comparison to MHC molecules and to the human cytomegalovirus MHC homolog. *J Virol*, 72(1):460–466, 1998.
- Chee, M. S., A. T. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, R. Cerny, T. Horsnell, C. A. r. Hutchison, T. Kouzarides, and J. A. Martignetti. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol*, 154:125–169, 1990.
- Chelbi-Alix, M. K., F. Quignon, L. Pelicano, M. H. Koken, and H. de Thé. Resistance to virus infection conferred by the interferon-induced promyelocytic leukemia protein. *J Virol*, 72(2):1043–1051, 1998.
- Cherepanov, P. P. and W. Wackernagel. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, 158(1):9–14, 1995.
- Child, S. J., M. Hakki, K. L. D. Niro, and A. P. Geballe. Evasion of cellular antiviral responses by human cytomegalovirus TRS1 and IRS1. *J Virol*, 78(1):197–205, 2004.
- Child, S. J., L. K. Hanson, C. E. Brown, D. M. Janzen, and A. P. Geballe. Double-stranded RNA binding by a heterodimeric complex of murine cytomegalovirus m142 and m143 proteins. *J Virol*, 80(20):10173–10180, 2006.
- Chupreta, S., S. Holmstrom, L. Subramanian, and J. A. Iñiguez-Lluhí. A small conserved surface in SUMO is the critical structural determinant of its transcriptional inhibitory properties. *Mol Cell Biol*, 25(10):4272–4282, 2005.
- Collins, T. M., M. R. Quirk, and M. C. Jordan. Biphasic viremia and viral gene expression in leukocytes during acute cytomegalovirus infection of mice. *J Virol*, 68(10):6305–6311, 1994.

- Cudmore, S., P. Cossart, G. Griffiths, and M. Way. Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature*, 378(6557):636–638, 1995.
- Dallas, P. B., P. A. Lyons, J. B. Hudson, A. A. Scalzo, and G. R. Shellam. Identification and characterization of a murine cytomegalovirus gene with homology to the UL25 open reading frame of human cytomegalovirus. *Virology*, 200(2):643–650, 1994.
- Davis-Poynter, N. J., D. M. Lynch, H. Vally, G. R. Shellam, W. D. Rawlinson, B. G. Barrell, and H. E. Farrell. Identification and characterization of a G protein-coupled receptor homolog encoded by murine cytomegalovirus. *J Virol*, 71(2):1521–1529, 1997.
- Davison, A. J. and D. Bhella. Comparative genome and virion structure. In E. S. Mocarski, editor, *Human Herpesviruses*, chapter 14, pp. 177–204. Cambridge University Press, 2007.
- Deakin, N. O. and C. E. Turner. Paxillin comes of age. *J Cell Sci*, 121(Pt 15):2435–2444, 2008.
- Dellaire, G. and D. P. Bazett-Jones. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays*, 26(9):963–977, 2004.
- den Broeke, C. V., M. Radu, M. Deruelle, H. Nauwynck, C. Hofmann, Z. M. Jaffer, J. Chernoff, and H. W. Favoreel. Alphaherpesvirus US3-mediated reorganization of the actin cytoskeleton is mediated by group A p21-activated kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(21):8707–8712, 2009.
- Dyck, J. A., G. G. Maul, W. H. Miller, J. D. Chen, A. Kakizuka, and R. M. Evans. A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell*, 76(2):333–343, 1994.
- Erlandsson, L., R. Blumenthal, M. L. Eloranta, H. Engel, G. Alm, S. Weiss, and T. Leanderson. Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Curr Biol*, 8(4):223–226, 1998.
- Eskiw, C. H., G. Dellaire, and D. P. Bazett-Jones. Chromatin contributes to structural integrity of promyelocytic leukemia bodies through a SUMO-1-independent mechanism. *J Biol Chem*, 279(10):9577–9585, 2004.
- Eskiw, C. H., G. Dellaire, J. S. Mymryk, and D. P. Bazett-Jones. Size, position and dynamic behavior of PML nuclear bodies following cell stress as a paradigm for supramolecular trafficking and assembly. *J Cell Sci*, 116(Pt 21):4455–4466, 2003.

-
- Everett, R. D. DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene*, 20(49):7266–7273, 2001.
- Everett, R. D. and J. Murray. ND10 components relocate to sites associated with herpes simplex virus type 1 nucleoprotein complexes during virus infection. *J Virol*, 79(8):5078–5089, 2005.
- Everett, R. D., S. Rechter, P. Papior, N. Tavalai, T. Stamminger, and A. Orr. PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0. *J Virol*, 80(16):7995–8005, 2006.
- Farrell, H. E. and G. R. Shellam. Characterization of neutralizing monoclonal antibodies to murine cytomegalovirus. *J Gen Virol*, 71 (Pt 3):655–664, 1990.
- Favoreel, H. W., G. V. Minnebruggen, D. Adriaensen, and H. J. Nauwynck. Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(25):8990–8995, 2005.
- Feire, A. L., H. Koss, and T. Compton. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(43):15470–15475, 2004.
- Fortunato, E. A. and D. H. Spector. Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Adv Virus Res*, 54:61–128, 1999.
- Francica, J. R., M. K. Matukonis, and P. Bates. Requirements for cell rounding and surface protein down-regulation by Ebola virus glycoprotein. *Virology*, 383(2):237–247, 2009.
- Frederickson, R. M., M. R. Micheau, A. Iwamoto, and N. G. Miyamoto. 5′ flanking and first intron sequences of the human beta-actin gene required for efficient promoter activity. *Nucleic Acids Res*, 17(1):253–270, 1989.
- Furukawa, T., A. Fioretti, and S. Plotkin. Growth characteristics of cytomegalovirus in human fibroblasts with demonstration of protein synthesis early in viral replication. *J Virol*, 11(6):991–997, 1973.
- Goley, E. D. and M. D. Welch. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(10):713–726, 2006.
- Gouin, E., M. D. Welch, and P. Cossart. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr Opin Microbiol*, 8(1):35–45, 2005.

- Guldner, H. H., C. Szostecki, T. Grötzinger, and H. Will. IFN enhance expression of Sp100, an autoantigen in primary biliary cirrhosis. *J Immunol*, 149(12):4067–4073, 1992.
- Guo, D., M. Li, Y. Zhang, P. Yang, S. Eckenrode, D. Hopkins, W. Zheng, S. Purohit, R. H. Podolsky, A. Muir, J. Wang, Z. Dong, T. Brusko, M. Atkinson, P. Pozzilli, A. Zeidler, L. J. Raffel, C. O. Jacob, Y. Park, M. Serrano-Rios, M. T. M. Larrad, Z. Zhang, H.-J. Garchon, J.-F. Bach, J. I. Rotter, J.-X. She, and C.-Y. Wang. A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet*, 36(8):837–841, 2004.
- Hecker, C.-M., M. Rabiller, K. Haglund, P. Bayer, and I. Dikic. Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem*, 281(23):16117–16127, 2006.
- Hildinger, M., K. L. Abel, W. Ostertag, and C. Baum. Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J Virol*, 73(5):4083–4089, 1999.
- Hirai, K., M. Fumiko, and Y. Watanabe. Expression of Early Virus Functions in Human Cytomegalovirus Infected HEL Cells: Effect of Ultraviolet Light-Irradiation of the Virus. *J Gen Virol*, 38:121–133, 1977.
- Holzenburg, A., A. Dittmer, and E. Bogner. Assembly of monomeric human cytomegalovirus pUL104 into portal structures. *J Gen Virol*, 90(Pt 10):2381–2385, 2009.
- Homman-Loudiyi, M., K. Hultenby, W. Britt, and C. Soderberg-Naucleer. Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into Golgi-derived vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II. *J Virol*, 77(5):3191–3203, 2003.
- Honess, R. W. and B. Roizman. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol*, 14(1):8–19, 1974.
- Huang, Z., J. Ling, and J. A. Traugh. Localization of p21-activated protein kinase gamma-PAK/Pak2 in the endoplasmic reticulum is required for induction of cytostasis. *J Biol Chem*, 278(15):13101–13109, 2003.
- Huber, M. T. and T. Compton. The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *J Virol*, 72(10):8191–8197, 1998.
- Isaacson, M. K., A. L. Feire, and T. Compton. Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *J Virol*, 81(12):6241–6247, 2007.

-
- Ishibe, S., D. Joly, X. Zhu, and L. G. Cantley. Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis. *Mol Cell*, 12(5):1275–1285, 2003.
- Ishov, A. M., A. G. Sotnikov, D. Negorev, O. V. Vladimirova, N. Neff, T. Kamitani, E. T. Yeh, J. F. Strauss, and G. G. Maul. PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol*, 147(2):221–234, 1999.
- Ishov, A. M., R. M. Stenberg, and G. G. Maul. Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment. *J Cell Biol*, 138(1):5–16, 1997.
- Jang, M., S. Ryu, and E. Kim. Modification of Daxx by small ubiquitin-related modifier-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 295:495–500, 2002.
- Jensen, K., C. Shiels, and P. S. Freemont. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene*, 20(49):7223–7233, 2001.
- Joazeiro, C. A. and A. M. Weissman. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, 102(5):549–552, 2000.
- Jockusch, B. M., P. Bubeck, K. Giehl, M. Kroemker, J. Moschner, M. Rothkegel, M. Rüdiger, K. Schlüter, G. Stanke, and J. Winkler. The molecular architecture of focal adhesions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11:379–416, 1995.
- Johnson, E. S. and A. A. Gupta. An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell*, 106(6):735–744, 2001.
- Jones, N. L., J. C. Lewis, and B. A. Kilpatrick. Cytoskeletal disruption during human cytomegalovirus infection of human lung fibroblasts. *Eur J Cell Biol*, 41(2):304–312, 1986.
- Jones, T. R. and V. P. Muzithras. A cluster of dispensable genes within the human cytomegalovirus genome short component: IRS1, US1 through US5, and the US6 family. *J Virol*, 66(4):2541–2546, 1992.
- Kahyo, T., T. Nishida, and H. Yasuda. Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell*, 8(3):713–718, 2001.
- Kalejta, R. F. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72(2):249–65, table of contents, 2008.

- Kamitani, T., K. Kito, H. P. Nguyen, H. Wada, T. Fukuda-Kamitani, and E. T. Yeh. Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem*, 273(41):26675–26682, 1998.
- Kari, B. and R. Gehrz. A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *J Virol*, 66(3):1761–1764, 1992.
- Kattenhorn, L. M., R. Mills, M. Wagner, A. Lomsadze, V. Makeev, M. Borodovsky, H. L. Ploegh, and B. M. Kessler. Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J Virol*, 78(20):11187–11197, 2004.
- Kinzler, E. R. and T. Compton. Characterization of human cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion. *J Virol*, 79(12):7827–7837, 2005.
- Kisseleva, T., S. Bhattacharya, J. Braunstein, and C. W. Schindler. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 285(1-2):1–24, 2002.
- Kwek, S. S., J. Derry, A. L. Tyner, Z. Shen, and A. V. Gudkov. Functional analysis and intracellular localization of p53 modified by SUMO-1. *Oncogene*, 20(20):2587–2599, 2001.
- Lamond, A. I. and D. L. Spector. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(8):605–612, 2003.
- Landolfo, S., M. Gariglio, G. Gribaudo, and D. Lembo. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther*, 98(3):269–297, 2003.
- Lavau, C., A. Marchio, M. Fagioli, J. Jansen, B. Falini, P. Lebon, F. Grosveld, P. P. Pandolfi, P. G. Pelicci, and A. Dejean. The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon. *Oncogene*, 11(5):871–876, 1995.
- Le, V. T. K., M. Trilling, A. Zimmermann, and H. Hengel. Mouse cytomegalovirus inhibits beta interferon (IFN-beta) gene expression and controls activation pathways of the IFN-beta enhanceosome. *J Gen Virol*, 89(Pt 5):1131–1141, 2008.
- Lee, G. W., F. Melchior, M. J. Matunis, R. Mahajan, Q. Tian, and P. Anderson. Modification of Ran GTPase-activating protein by the small ubiquitin-related modifier SUMO-1 requires Ubc9, an E2-type ubiquitin-conjugating enzyme homologue. *J Biol Chem*, 273(11):6503–6507, 1998.
- Lee, H.-R., D.-J. Kim, J.-M. Lee, C. Y. Choi, B.-Y. Ahn, G. S. Hayward, and J.-H. Ahn. Ability of the human cytomegalovirus IE1 protein to modulate sumoylation of PML

-
- correlates with its functional activities in transcriptional regulation and infectivity in cultured fibroblast cells. *J Virol*, 78(12):6527–6542, 2004.
- Lin, X., B. Sun, M. Liang, Y.-Y. Liang, A. Gast, J. Hildebrand, F. C. Brunicardi, F. Melchior, and X.-H. Feng. Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol Cell*, 11(5):1389–1396, 2003.
- Liu, Y. and B. J. Biegalko. The human cytomegalovirus UL35 gene encodes two proteins with different functions. *J Virol*, 76(5):2460–2468, 2002.
- Lockridge, K. M., G. Sequar, S. S. Zhou, Y. Yue, C. P. Mandell, and P. A. Barry. Pathogenesis of experimental rhesus cytomegalovirus infection. *J Virol*, 73(11):9576–9583, 1999.
- Loesing, J.-B., S. D. Fiore, K. Ritter, R. Fischer, and M. Kleines. Epstein-Barr virus BDLF2-BMRF2 complex affects cellular morphology. *J Gen Virol*, 90(Pt 6):1440–1449, 2009.
- Lombardo, E., J. C. Ramírez, M. Agbandje-McKenna, and J. M. Almendral. A beta-stranded motif drives capsid protein oligomers of the parvovirus minute virus of mice into the nucleus for viral assembly. *J Virol*, 74(8):3804–3814, 2000.
- Lovering, R., I. M. Hanson, K. L. Borden, S. Martin, N. J. O’Reilly, G. I. Evan, D. Rahman, D. J. Pappin, J. Trowsdale, and P. S. Freemont. Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(6):2112–2116, 1993.
- Luthman, H. and G. Magnusson. High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Res*, 11(5):1295–1308, 1983.
- Mack, C., A. Sickmann, D. Lembo, and W. Brune. Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(8):3094–3099, 2008.
- Mack, C. P. and G. K. Owens. Regulation of smooth muscle alpha-actin expression in vivo is dependent on CArG elements within the 5’ and first intron promoter regions. *Circ Res*, 84(7):852–861, 1999.
- Mahajan, R., L. Gerace, and F. Melchior. Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *J Cell Biol*, 140(2):259–270, 1998.

- Margolis, M. J., S. Pajovic, E. L. Wong, M. Wade, R. Jupp, J. A. Nelson, and J. C. Azizkhan. Interaction of the 72-kilodalton human cytomegalovirus IE1 gene product with E2F1 coincides with E2F-dependent activation of dihydrofolate reductase transcription. *J Virol*, 69(12):7759–7767, 1995.
- Marshall, E. E. and A. P. Geballe. Multifaceted evasion of the interferon response by cytomegalovirus. *J Interferon Cytokine Res*, 29(9):609–619, 2009.
- Mathys, S., T. Schroeder, J. Ellwart, U. H. Koszinowski, M. Messerle, and U. Just. Dendritic cells under influence of mouse cytomegalovirus have a physiologic dual role: to initiate and to restrict T cell activation. *J Infect Dis*, 187(6):988–999, 2003.
- Matsuzaki, K., T. Minami, M. Tojo, Y. Honda, N. Saitoh, S. Nagahiro, H. Saya, and M. Nakao. PML-nuclear bodies are involved in cellular serum response. *Genes Cells*, 8(3):275–286, 2003a.
- Matsuzaki, K., T. Minami, M. Tojo, Y. Honda, Y. Uchimura, H. Saitoh, H. Yasuda, S. Nagahiro, H. Saya, and M. Nakao. Serum response factor is modulated by the SUMO-1 conjugation system. *Biochem Biophys Res Commun*, 306(1):32–38, 2003b.
- Matunis, M. J., E. Coutavas, and G. Blobel. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, 135(6 Pt 1):1457–1470, 1996.
- Maul, G. G., A. M. Ishov, and R. D. Everett. Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1. *Virology*, 217(1):67–75, 1996.
- Melchior, F. SUMO–nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16:591–626, 2000.
- Mercer, J. A. and D. H. Spector. Pathogenesis of acute murine cytomegalovirus infection in resistant and susceptible strains of mice. *J Virol*, 57(2):497–504, 1986.
- Messerle, M., B. Bühler, G. M. Keil, and U. H. Koszinowski. Structural organization, expression, and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediate-early gene 3. *J Virol*, 66(1):27–36, 1992.
- Mettenleiter, T. C., B. G. Klupp, and H. Granzow. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol*, 9(4):423–429, 2006.
- Miano, J. M., X. Long, and K. Fujiwara. Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(1):C70–C81, 2007.

-
- Minty, A., X. Dumont, M. Kaghad, and D. Caput. Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem*, 275(46):36316–36323, 2000.
- Miyamoto, Y., J. Yamauchi, J. R. Chan, A. Okada, Y. Tomooka, S. ichi Hisanaga, and A. Tanoue. Cdk5 regulates differentiation of oligodendrocyte precursor cells through the direct phosphorylation of paxillin. *J Cell Sci*, 120(Pt 24):4355–4366, 2007.
- Müller, S. and A. Dejean. Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol*, 73(6):5137–5143, 1999.
- Mocarski, E., T. Shenk, and R. Pass. Cytomegaloviruses. In D. Knipe and P. Howley, editors, *Fields Virology*, volume 2, chapter 69, pp. 2703–2773. Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- Mocarski, E. S. Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol*, 10(7):332–339, 2002.
- Moiseyeva, E. P., P. A. Weller, N. I. Zhidkova, E. B. Corben, B. Patel, I. Jasinska, V. E. Koteliansky, and D. R. Critchley. Organization of the human gene encoding the cytoskeletal protein vinculin and the sequence of the vinculin promoter. *J Biol Chem*, 268(6):4318–4325, 1993.
- Morales, I., M. A. Carbajal, S. Bohn, D. Holzer, S. E. M. Kato, F. A. B. Greco, N. Moussatché, and J. K. Locker. The vaccinia virus F11L gene product facilitates cell detachment and promotes migration. *Traffic*, 9(8):1283–1298, 2008.
- Muller, S., M. Berger, F. Lehembre, J. S. Seeler, Y. Haupt, and A. Dejean. c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem*, 275(18):13321–13329, 2000.
- Muratani, M., D. Gerlich, S. M. Janicki, M. Gebhard, R. Eils, and D. L. Spector. Metabolic-energy-dependent movement of PML bodies within the mammalian cell nucleus. *Nat Cell Biol*, 4(2):106–110, 2002.
- Nacerddine, K., F. Lehembre, M. Bhaumik, J. Artus, M. Cohen-Tannoudji, C. Babinet, P. P. Pandolfi, and A. Dejean. The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell*, 9(6):769–779, 2005.
- Nayal, A., D. J. Webb, C. M. Brown, E. M. Schaefer, M. Vicente-Manzanares, and A. R. Horwitz. Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1-PIX-PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics. *J Cell Biol*, 173(4):587–589, 2006.

- Negorev, D. and G. G. Maul. Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene*, 20(49):7234–7242, 2001.
- Netterwald, J. R., T. R. Jones, W. J. Britt, S.-J. Yang, I. P. McCrone, and H. Zhu. Postattachment events associated with viral entry are necessary for induction of interferon-stimulated genes by human cytomegalovirus. *J Virol*, 78(12):6688–6691, 2004.
- Nevels, M., C. Paulus, and T. Shenk. Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(49):17234–17239, 2004.
- Ogawa-Goto, K., K. Tanaka, W. Gibson, E. Moriishi, Y. Miura, T. Kurata, S. Irie, and T. Sata. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J Virol*, 77(15):8541–8547, 2003.
- Ogg, S. C. and A. I. Lamond. Cajal bodies and coilin—moving towards function. *J Cell Biol*, 159(1):17–21, 2002.
- Okuma, T., R. Honda, G. Ichikawa, N. Tsumagari, and H. Yasuda. In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2. *Biochem Biophys Res Commun*, 254(3):693–698, 1999.
- Paulus, C., S. Krauss, and M. Nevels. A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(10):3840–3845, 2006.
- Pellett, P. E. and B. Roizman. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In D. M. Knipe and P. M. Howley, editors, *Fields Virology*, volume 2, chapter 66, pp. 2479–2499. Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- Percivalle, E., M. G. Revello, L. Vago, F. Morini, and G. Gerna. Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement. *J Clin Invest*, 92(2):663–670, 1993.
- Pollard, T. D. and J. A. Cooper. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, 326(5957):1208–1212, 2009.
- Poncet, D., A.-L. Pauleau, G. Szabadkai, A. Vozza, S. R. Scholz, M. Le Bras, J.-J. Briere, A. Jalil, R. Le Moigne, C. Brenner, G. Hahn, I. Wittig, H. Schagger, C. Lemaire, K. Bianchi, S. Souquere, G. Pierron, P. Rustin, V. S. Goldmacher, R. Rizzuto, F. Palmieri, and G. Kroemer. Cytopathic effects of the cytomegalovirus-encoded apoptosis inhibitory protein vMIA. *J Cell Biol*, 174(7):985–996, 2006.

-
- Radtke, K., K. Dohner, and B. Sodeik. Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol*, 8(3):387–400, 2006.
- Randall, R. E. and S. Goodbourn. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol*, 89(Pt 1):1–47, 2008.
- Rawlinson, W. D., H. E. Farrell, and B. G. Barrell. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol*, 70(12):8833–8849, 1996.
- Regad, T. and M. K. Chelbi-Alix. Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene*, 20(49):7274–7286, 2001.
- Ryckman, B. J., M. A. Jarvis, D. D. Drummond, J. A. Nelson, and D. C. Johnson. Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J Virol*, 80(2):710–722, 2006.
- Ryckman, B. J., B. L. Rainish, M. C. Chase, J. A. Borton, J. A. Nelson, M. A. Jarvis, and D. C. Johnson. Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *J Virol*, 82(1):60–70, 2008.
- Saitoh, H. and J. Hinchey. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem*, 275(9):6252–6258, 2000.
- Salsman, J., N. Zimmerman, T. Chen, M. Domagala, and L. Frappier. Genome-wide screen of three herpesviruses for protein subcellular localization and alteration of PML nuclear bodies. *PLoS Pathog*, 4(7):e1000100, 2008.
- Salzberger, B., D. Myerson, and M. Boeckh. Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in marrow transplant patients with CMV disease and CMV infection. *J Infect Dis*, 176(3):778–781, 1997.
- Samuel, C. E. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev*, 14(4):778–809, table of contents, 2001.
- Sanchez, V., E. Sztul, and W. J. Britt. Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment. *J Virol*, 74(8):3842–3851, 2000.
- Sanderson, C. M., M. Way, and G. L. Smith. Virus-induced cell motility. *J Virol*, 72(2):1235–1243, 1998.

- Saurin, A. J., C. Shiels, J. Williamson, D. P. Satijn, A. P. Otte, D. Sheer, and P. S. Freemont. The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain. *J Cell Biol*, 142(4):887–898, 1998.
- Schambach, A., D. Mueller, M. Galla, M. M. A. Verstegen, G. Wagemaker, R. Loew, C. Baum, and J. Bohne. Overcoming promoter competition in packaging cells improves production of self-inactivating retroviral vectors. *Gene Ther*, 13(21):1524–1533, 2006.
- Schierling, K., C. Buser, T. Mertens, and M. Winkler. Human cytomegalovirus tegument protein ppUL35 is important for viral replication and particle formation. *J Virol*, 79(5):3084–3096, 2005.
- Schierling, K., T. Stamminger, T. Mertens, and M. Winkler. Human cytomegalovirus tegument proteins ppUL82 (pp71) and ppUL35 interact and cooperatively activate the major immediate-early enhancer. *J Virol*, 78(17):9512–9523, 2004.
- Scholz, M., A. Hamann, R. A. Blaheta, M. K. Auth, A. Encke, and B. H. Markus. Cytomegalovirus- and interferon-related effects on human endothelial cells. Cytomegalovirus infection reduces upregulation of HLA class II antigen expression after treatment with interferon-gamma. *Hum Immunol*, 35(4):230–238, 1992.
- Sedmak, D. D., A. M. Guglielmo, D. A. Knight, D. J. Birmingham, E. H. Huang, and W. J. Waldman. Cytomegalovirus inhibits major histocompatibility class II expression on infected endothelial cells. *Am J Pathol*, 144(4):683–692, 1994.
- Sengstake, S. *Identification of Mouse Cytomegalovirus Factors that determine the tropism for epithelial cells and that induce morphological changes in infected cells*. Ph.D. thesis, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2009.
- Sengstake, S., C. Benkartek, M. Glass, and M. Messerle. The mouse cytomegalovirus M25 gene affects cytopathic effect, 2010. In preparation.
- Sharon-Friling, R., J. Goodhouse, A. M. Colberg-Poley, and T. Shenk. Human cytomegalovirus pUL37x1 induces the release of endoplasmic reticulum calcium stores. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(50):19117–19122, 2006.
- Shen, T. H., H.-K. Lin, P. P. Scaglioni, T. M. Yung, and P. P. Pandolfi. The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell*, 24(3):331–339, 2006.
- Sinclair, J. and P. Sissons. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol*, 87(Pt 7):1763–1779, 2006.

-
- Singh, R. R., C. Song, Z. Yang, and R. Kumar. Nuclear localization and chromatin targets of p21-activated kinase 1. *J Biol Chem*, 280(18):18130–18137, 2005.
- Smith, L. M., G. R. Shellam, and A. J. Redwood. Genes of murine cytomegalovirus exist as a number of distinct genotypes. *Virology*, 352(2):450–465, 2006.
- Spengler, M. L., K. Kurapatwinski, A. R. Black, and J. Azizkhan-Clifford. SUMO-1 modification of human cytomegalovirus IE1/IE72. *J Virol*, 76(6):2990–2996, 2002.
- Stanton, R. J., B. P. McSharry, C. R. Rickards, E. C. Y. Wang, P. Tomasec, and G. W. G. Wilkinson. Cytomegalovirus destruction of focal adhesions revealed in a high-throughput Western blot analysis of cellular protein expression. *J Virol*, 81(15):7860–7872, 2007.
- Stenberg, R. M. and M. F. Stinski. Autoregulation of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *J Virol*, 56(3):676–682, 1985.
- Sternsdorf, T., K. Jensen, B. Reich, and H. Will. The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers. *J Biol Chem*, 274(18):12555–12566, 1999.
- Sternsdorf, T., K. Jensen, and H. Will. Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J Cell Biol*, 139(7):1621–1634, 1997.
- Stocchi, R., K. N. Ward, R. Fanin, M. Bacarani, and J. F. Apperley. Management of human cytomegalovirus infection and disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica*, 84(1):71–79, 1999.
- Sullivan, N. J., M. Peterson, Z. yong Yang, W. pui Kong, H. Duckers, E. Nabel, and G. J. Nabel. Ebola virus glycoprotein toxicity is mediated by a dynamin-dependent protein-trafficking pathway. *J Virol*, 79(1):547–553, 2005.
- Takahashi, H., S. Hatakeyama, H. Saitoh, and K. I. Nakayama. Noncovalent SUMO-1 binding activity of thymine DNA glycosylase (TDG) is required for its SUMO-1 modification and colocalization with the promyelocytic leukemia protein. *J Biol Chem*, 280(7):5611–5621, 2005.
- Takahashi, Y., V. Lallemand-Breitenbach, J. Zhu, and H. de Thé. PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene*, 23(16):2819–2824, 2004.
- Tang, Q. and G. G. Maul. Mouse cytomegalovirus immediate-early protein 1 binds with host cell repressors to relieve suppressive effects on viral transcription and replication during lytic infection. *J Virol*, 77(2):1357–1367, 2003.

- Tavalai, N., P. Papior, S. Rechter, M. Leis, and T. Stamminger. Evidence for a role of the cellular ND10 protein PML in mediating intrinsic immunity against human cytomegalovirus infections. *J Virol*, 80(16):8006–8018, 2006.
- Taylor, R. T. and W. A. Bresnahan. Human cytomegalovirus IE86 attenuates virus- and tumor necrosis factor alpha-induced NFkappaB-dependent gene expression. *J Virol*, 80(21):10763–10771, 2006.
- Terhune, S. S., J. Schröer, and T. Shenk. RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *J Virol*, 78(19):10390–10398, 2004.
- Thomas, J. W., M. A. Cooley, J. M. Broome, R. Salgia, J. D. Griffin, C. R. Lombardo, and M. D. Schaller. The role of focal adhesion kinase binding in the regulation of tyrosine phosphorylation of paxillin. *J Biol Chem*, 274(51):36684–36692, 1999.
- Tsukamoto, T., N. Hashiguchi, S. M. Janicki, T. Tumbar, A. S. Belmont, and D. L. Spector. Visualization of gene activity in living cells. *Nat Cell Biol*, 2(12):871–878, 2000.
- Tsukita, S. and S. Yonemura. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem*, 274(49):34507–34510, 1999.
- Valderrama, F., J. V. Cordeiro, S. Schleich, F. Frischknecht, and M. Way. Vaccinia virus-induced cell motility requires F11L-mediated inhibition of RhoA signaling. *Science*, 311(5759):377–381, 2006.
- Van Minnebruggen, G., H. W. Favoreel, L. Jacobs, and H. J. Nauwynck. Pseudorabies virus US3 protein kinase mediates actin stress fiber breakdown. *J Virol*, 77(16):9074–9080, 2003.
- Vertegaal, A. C. O., J. S. Andersen, S. C. Ogg, R. T. Hay, M. Mann, and A. I. Lamond. Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 5(12):2298–2310, 2006.
- Wagner, M., S. Jonjic, U. H. Koszinowski, and M. Messerle. Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J Virol*, 73(8):7056–7060, 1999.
- Wang, J., C. Shiels, P. Sasieni, P. J. Wu, S. A. Islam, P. S. Freemont, and D. Sheer. Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions. *J Cell Biol*, 164(4):515–526, 2004.

-
- Warren, A. P., C. N. Owens, L. K. Borysiewicz, and K. Patel. Down-regulation of integrin alpha 1/beta 1 expression and association with cell rounding in human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *J Gen Virol*, 75:3319–3325, 1994.
- Weber, F., V. Wagner, S. B. Rasmussen, R. Hartmann, and S. R. Paludan. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol*, 80(10):5059–5064, 2006.
- Weiner, M. P., G. L. Costa, W. Schoettlin, J. Cline, E. Mathur, and J. C. Bauer. Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene*, 151(1-2):119–123, 1994.
- Wu, C. A., M. E. Carlson, S. C. Henry, and J. D. Shanley. The murine cytomegalovirus M25 open reading frame encodes a component of the tegument. *Virology*, 262(2):265–276, 1999.
- Zhan, X., M. Lee, G. Abenes, I. Von Reis, C. Kittinunvorakoon, P. Ross-Macdonald, M. Snyder, and F. Liu. Mutagenesis of murine cytomegalovirus using a Tn3-based transposon. *Virology*, 266(2):264–274, 2000.
- Zheng, G. and Y.-C. Yang. ZNF76, a novel transcriptional repressor targeting TATA-binding protein, is modulated by sumoylation. *J Biol Chem*, 279(41):42410–42421, 2004.
- Zhong, S., S. Müller, S. Ronchetti, P. S. Freemont, A. Dejean, and P. P. Pandolfi. Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood*, 95(9):2748–2752, 2000a.
- Zhong, S., P. Salomoni, and P. P. Pandolfi. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol*, 2(5):E85–E90, 2000b.
- Zhu, H., J. P. Cong, and T. Shenk. Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(25):13985–13990, 1997.
- Zimmermann, A., M. Trilling, M. Wagner, M. Wilborn, I. Bubic, S. Jonjic, U. Koszinowski, and H. Hengel. A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN- γ signaling and antiviral responses. *J Exp Med*, 201(10):1543–1553, 2005.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematischer Aufbau der Herpesviren.	2
1.2	Replikationszyklus der Herpesviren.	4
1.3	Organisation des MCMV-Genoms.	7
1.4	Vereinfachtes Modell der Cytoskelett-Reorganisation durch Fokalkontakte.	10
1.5	Zellmorphologie während einer MCMV-Infektion.	15
1.6	Kinetik der M25-Expression.	16
1.7	Synthese der M25-Proteine.	17
1.8	Umgehung der frühen IFN-Antwort durch Cytomegaloviren.	20
1.9	CMV-induzierte Blockade der Interferon-Signalvermittlung.	21
1.10	SUMO-vermittelte Protein-Protein-Interaktionen.	23
2.1	Mutagenisierung von Plasmiden mit der Quick Mutagenese PCR.	42
2.2	Schematische Darstellung der Flp-vermittelten Rekombination.	54
3.1	Einfluss von M25-Proteinen auf die virale Proteinexpression.	60
3.2	Einfluss von M25-Proteinen auf die virale Replikation.	61
3.3	Schematische Darstellung der Herstellung von MCMV-GFP M25HA.	63
3.4	Subzelluläre Lokalisation der M25HA-Proteine im Verlauf der MCMV-Infektion.	64
3.5	Klonierungsstrategie zur Herstellung von retroviralen Expressionsvektoren.	67
3.6	Expression von M25-Proteinen durch retrovirale Vektoren.	69
3.7	Subzelluläre Lokalisation der M25-ATG2- und M25-ATG6-Proteine.	70
3.8	Morphologie der M25-ATG6-Aggregate im Zellkern.	71
3.9	Lage eines potentiellen Kernimportsignals (NLS) in der M25-Aminosäuresequenz.	72
3.10	Strategie zur Herstellung des retroviralen Expressionsvektors pSF ATG6 NLSmut.	73
3.11	Subzelluläre Lokalisation von M25-ATG6-Proteinen nach Mutation des Kern- importsignals.	75
3.12	Mutation des M25-Kernimportsignals im MCMV-Genom.	76
3.13	M25-Proteinexpression durch MCMV-GFP M25HA NLSmut.	77

3.14	Subzelluläre Lokalisation der M25HA NLSmut-Proteine im Verlauf der MCMV-Infektion.	79
3.15	Veränderung der Morphologie M25-exprimierender Zellen.	81
3.16	Einfluss der Mutation des Kernimportsignals im M25-ATG6 ORF auf die Zellmorphologie.	82
3.17	Zellabrundung nach Infektion mit MCMV-GFP M25HA NLSmut.	84
3.18	Darstellung der Fokalkontakte MCMV-infizierter Zellen anhand von Paxillin.	85
3.19	Lokalisation des Fokalkontakt-assoziierten Proteins Paxillin in retroviral transduzierten Zellen.	87
3.20	Kolokalisation der M25-Proteine M25-ATG2 und M25-ATG6 mit nukleären ND10 <i>domains</i>	89
3.21	Veränderung der zellulären ND10 <i>domains</i> durch die retrovirale Expression von M25-Proteinen.	91
3.22	Anzahl der ND10 <i>domains</i> in M25 exprimierenden Fibroblasten.	92
3.23	Morphologie und Lokalisation von ND10 <i>domains</i> in M25-ATG6 NLSmut-exprimierenden Fibroblasten.	94
3.24	Anzahl der ND10 <i>domains</i> in M25-ATG6 NLSmut-exprimierenden Fibroblasten.	95
3.25	Replikation von MCMV-GFP und MCMV-GFP Δ M25 in Abhängigkeit von IFN β	96
3.26	Einfluss der MCMV-Infektion auf PML-Proteine.	99
3.27	Subzelluläre Lokalisation der M25HA NLSmut- und PML-Proteine in MCMV-infizierten MEF.	101
3.28	Schematische Darstellung der potentiellen SUMO <i>interacting motifs</i> im M25 ORF.	102
3.29	Mutation der potentiellen SIMs im retroviralen Vektor pSF M25-ATG6. . .	103
3.30	Subzelluläre Lokalisation der M25 SIM-Varianten und PML-Proteine. . . .	105
4.1	Mögliche Funktionen und Eigenschaften der M25-Proteine.	126

Tabellenverzeichnis

1.1	Beispiele für ND10 <i>domain</i> -assoziierte Proteine	27
2.1	Verwendete Laborgeräte und Materialien	32
2.2	Antikörper für Immunfluoreszenz und Immunoblots	34
2.3	Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur	36
2.4	Lösungen für die Präparation von Plasmid-DNA	39
2.5	Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese	41
2.6	Mit der Quick Mutagenese PCR modifizierte Plasmide	43
2.7	Lösungen für die Herstellung von Proteinlysaten	44
2.8	Lösungen für die SDS-PAGE	45
2.9	Verdünnung der Antikörper für Immunfärbungen	46
2.10	Verdünnung der Antikörper für Immunfluoreszenz	48
2.11	Lösungen zur Präparation viraler DNA	52
2.12	Durch Flp-vermittelte Rekombination hergestellte BACs	55
2.13	Retrovirale Vektoren	57
3.1	Durchschnittliche Anzahl der ND10 <i>domains</i> pro Zellkern in retroviral transduzierten Zellen.	92
3.2	Virale Titer von MCMV-GFP und MCMV-GFP Δ M25 in Kulturen mit und ohne IFN β -Stimulation.	97

Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Amp	Ampicillin
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i> , artifizielles Bakterienchromosom
bp	<i>basepairs</i> , Basenpaare
Cam	Cloramphenicol
CMV	Cytomegalovirus
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d p.i.	<i>days post infection</i> , Tage nach Infektion
E	<i>Early</i> (-Protein/ -Gen)
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERM	Ezrin/ Radixin/ Moesin-Proteine
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
Flp	Flippase
FRT	<i>Flippase recognition target</i> , Flippase Zielsequenz
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HA	Influenza-Virus Hämagglutinin
HCMV	humanes Cytomegalovirus
h p.i.	<i>hours post infection</i> , Stunden nach Infektion
HSV	Herpes Simplex Virus
IE	<i>Immediate Early</i> (-Protein/ -Gen)
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon α/β -Rezeptor
IFNGR	Interferon γ -Rezeptor

IRES	<i>internal ribosom entry site</i> , interne Ribosomen-Bindestelle
ISG	Interferon-stimulierte Gene
ISRE	<i>interferon stimulated response element</i>
IU	<i>infectious units</i> , infektiöse Einheiten
Kan	Kanamycin
kDa	kilo Dalton
L	<i>Late</i> (-Protein/ -Gen)
LB	Luria Bertani
LTR	<i>long terminal repeats</i>
µg/ µm	Mikrogramm/ Mikrometer
M	molar
MCMV	murines Cytomegalovirus
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MLV	<i>Murine Leukemia Virus</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
ND10	<i>nuclear domain 10</i>
ng/ nm	Nanogramm/ Nanometer
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kernimportsignal
OD	<i>optical density</i> , optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
PAK	<i>p21-activated kinase</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PFU	<i>plaque forming units</i> , Plaque-formende Einheiten
PML	<i>promyelocytic leukemia</i> -Protein
PRV	Pseudo Rabies Virus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SIM	<i>SUMO interacting motif</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-isothiocyanat
vMIA	<i>viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis</i>
wpre	<i>woodchuck posttranscriptional regulatory element</i>

2. Primersequenzen

Primer für die Herstellung von pOri M25HA:

OriM25HA.for: 5'Pho-gccggactacgcgTAATCTTAGATTAATCAG-3'

OriM25HA.rev: 5'Pho-acgtcgtacgggtaCAGAAAGGTACGCTTGGAG-3'

Die Primer sind am 5'-Ende phosphoryliert. Kleinbuchstaben kennzeichnen die Sequenz für das HA-Epitop.

Primer für die Herstellung von pOri M25HA NLSmut und pSF ATG6 NLSmut:

M25NLSmut.for: 5'Pho-AGTgcaCCTTCGACCAAAAAATCGGCG-3'

M25NLSmut.rev: 5'Pho-tgctgctgcCAGTTTGGGTGGGCTCGG-3'

Die Primer sind am 5'-Ende phosphoryliert. Kleinbuchstaben kennzeichnen die modifizierte Sequenz.

Primer für die Herstellung von pSF β 91-ieGFP-AgeI-MfeI:

pSFbeta91Mfe.for: 5'Pho-GACcaattgCACTGTGCTGGATATCTGCAG-3'

pSFbeta91Age.rev: 5'Pho-GCGaccggtGCGGCCGCTGTAAGTGAGC-3'

Die Primer sind am 5'-Ende phosphoryliert. Kleinbuchstaben kennzeichnen die eingefügten Schnittstellen.

Primer für die Herstellung von pSF M25-ATG2:

ATG2Age.for: 5'-GCGaccggtACCACCATGAACCGTCGATCCTCCAAG-3'

M25Mfe.rev: 5'-CCGcaattgCGCGGTACCGTCGACTGCAG-3'

Kleinbuchstaben kennzeichnen die eingefügten Schnittstellen.

Primer für die Herstellung von pSF M25-ATG6:

ATG6Age.for 5'-GCGaccggtACCACCATGTCACGCGACGGACCCCG-3'

M25Mfe.rev: s.o.

Kleinbuchstaben kennzeichnen die eingefügten Schnittstellen.

Primer für die SIM-Mutation in pSF M25-ATG6:

pSF ATG6 SIM2mut

SIM2mut.for: 5'Pho-gcagcaGACGACGACGACGGAGATTATG-3'

SIM2mut.rev: 5'Pho-tgctgcGTGTCGCGAATCGTCGCGCG-3'

pSF ATG6 SIM3mut

SIM3mut.for 5'Pho-gcagcaGAAGATGACGAGGACGAAGAG-3'

SIM3mut.rev 5'Pho-tgctgcCATGGCGGTGGCGGATATCGG-3'

pSF ATG6 SIM4mut

SIM4mut.for 5'Pho-gcagcaGATGATGATGAAGAAGAGGAG-3'

SIM4mut.rev 5'Pho-tgctgcAGACGCGTCGTCGGCGGCG-3'

Die Primer sind am 5'-Ende phosphoryliert. Kleinbuchstaben kennzeichnen die modifizierte Sequenz.

3. M25-Aminosäuresequenz

MSQFVQHVADRGLGVVHQRLARGVEPRADFPRIHLRIRT
 LPRDGDVQLYKITRAGVCVPAVLFPV ^{→ Transkriptionsstart (DNA-Sequenz)} PARPFRPRTPVREPP
 LTRT ^{ATG2} **M** NRRSSKDRRMFVTDDSSDDDD **DVMIM** ^{SIM 1} DPPETTS
 SSSSALATAAGIRGVPHAPASNSATAAAASESTYKPLSIPSE
^{→ Transkriptionsstart (DNA-Sequenz)} ELNGEEEEERDEED ^{ATG6} **M** SRDGPRRHSQDDDFTYADPADVRLR
 AMMGNRYGGQSRSAATAGAASRNDSGSVSPVTLFDEDGY
 AIIPDPPTS RDDSRH **VVVD** ^{SIM 2} DDDDGDYDSHYGVMTVAPSPP
 KL **PRKSRPS** ^{NLS} TKKSAEEKQSSTAGRSRGRSTAR RTPKKAQE
 TAPAAAAGSGARQKQRQQQQQQPPRRQSYHPPPDYPPPP
 PPVQATVSRPLPRTPNANDDDDDDDNDDEPGPSNTRRGKTP
 CRRVDHTENNHLYETPISATAM **VIDI** ^{SIM 3} EDDDEDEETGGAADDAS
IVVE ^{SIM 4} DDDEEEENDCEEICDGEEEPAAAAAAAASSSTPHRT
QPLPVPPSSPRITRELGLPLGVVSGQDARFIAACLHHSHAP
QVDIINTCYPMPPTYTLDALSEPVLTKKALRCAGVLRPVIKLA
LVNYYCVGIGRLARARALSKDLMTPPRIETLRRRLEGLLPQQ
TSPSPPMCLRVLGRLNITAAQHKASCDTIDQLMKPMQERER
RRQKTQCAQLFRSKNLLFSPPRFTREGAKTLYMRNIKILNSD
EEDTTLNLVMTLNPHTREDVLNDAIFCLSLGNFVYNFSRAL
EELRGMIRCQFEDLTETLYAAYYQCPIMRDDYRVLCSEVANE
ITSPREDGQGLSALCRRSLAFARRCYNEGVFFSPSYVKYLIK
CAAMEEAGFEGYSLESAARSLANPDIFRPLPDESSARRMLR
RTIHFVRVDGTPSSSRQIPTTHIPTHANYELFLQASRMIVPQQ
 QQSRRSSTPPPPSSSPPPPAAGGPKYSKRTFL.

Lebenslauf

Name: Corinna Benkartek
Geburtstag: 13.11.1979 in Heide

Ausbildung

seit Jan. 2006	Doktorarbeit an der Medizinischen Hochschule Hannover, Institut für Virologie
Feb.-Nov. 2005	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig
Jan. 2005	Diplom (Genetik, Zellbiologie, Mikrobiologie) „Sehr gut“
Jun. 2002	Vordiplom (Botanik, Genetik, Mathematik, Mikrobiologie, Zoologie) Note: 1,7
2000 bis 2005	Studium „Diplom-Biologie“ an der Technischen Universität Carolo Wilhelmina Braunschweig

Schulbildung

1990 bis 1999	Besuch des Gymnasiums Heide-Ost Abschluss Abitur, Durchschnittsnote: 2,6
1986 bis 1990	Besuch der St.-Georg-Grundschule Heide

Publikationsliste

Wissenschaftliche Publikationen

Borst EM, Benkartek C, Messerle M.

„Use of bacterial artificial chromosomes in generating targeted mutations in human and mouse cytomegaloviruses“

Curr Protoc Immunol. 2007 May;Chapter 10:Unit 10.32.

Barkovits K, Harms A, Benkartek C, Smart JL, Frankenberg-Dinkel N.

„Expression of the phytochrome operon in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on the alternative sigma factor RpoS“

FEMS Microbiol Lett. 2008 Mar;280(2):160-8. Epub 2008 Jan 31

Sengstake S, Benkartek C, Glass M, Messerle M.

„The mouse cytomegalovirus M25 gene affects cytopathic effect“

In Vorbereitung

Tagungsbeiträge

Corinna Benkartek, Sarah Sengstake und Martin Messerle

„A mouse cytomegalovirus protein is key for virus induced cell rounding“

International Herpesvirus Workshop, Ithaca, USA, 2009 (Vortrag und Poster)

Corinna Benkartek, Sarah Sengstake und Martin Messerle

„A Mouse Cytomegalovirus Protein Involved in Virus Induced Cell Rounding Colocalizes to Nuclear ND10 Domains“

19th Annual Meeting of the German Society for Virology (GfV), Leipzig, 2009 (Poster)

Sarah Sengstake, Corinna Benkartek, Andreas Busche und Martin Messerle

„Characterisation of a gene involved in mouse CMV-induced cell rounding“

International Herpesvirus Workshop, Estoril, Portugal, 2008 (Poster)

Erklärung zur Dissertation

gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Eigenschaften und Funktion der M25-Proteine des murinen Cytomegalovirus - Schlüsselfaktoren des viral induzierten cytopathischen Effekts“

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Corinna Benkartek